

N° D'ORDRE : 663

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean Pierre BACHELLERIE

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE D'UNITES CHROMATINIENNES ACTIVEMENT TRANSCRITES

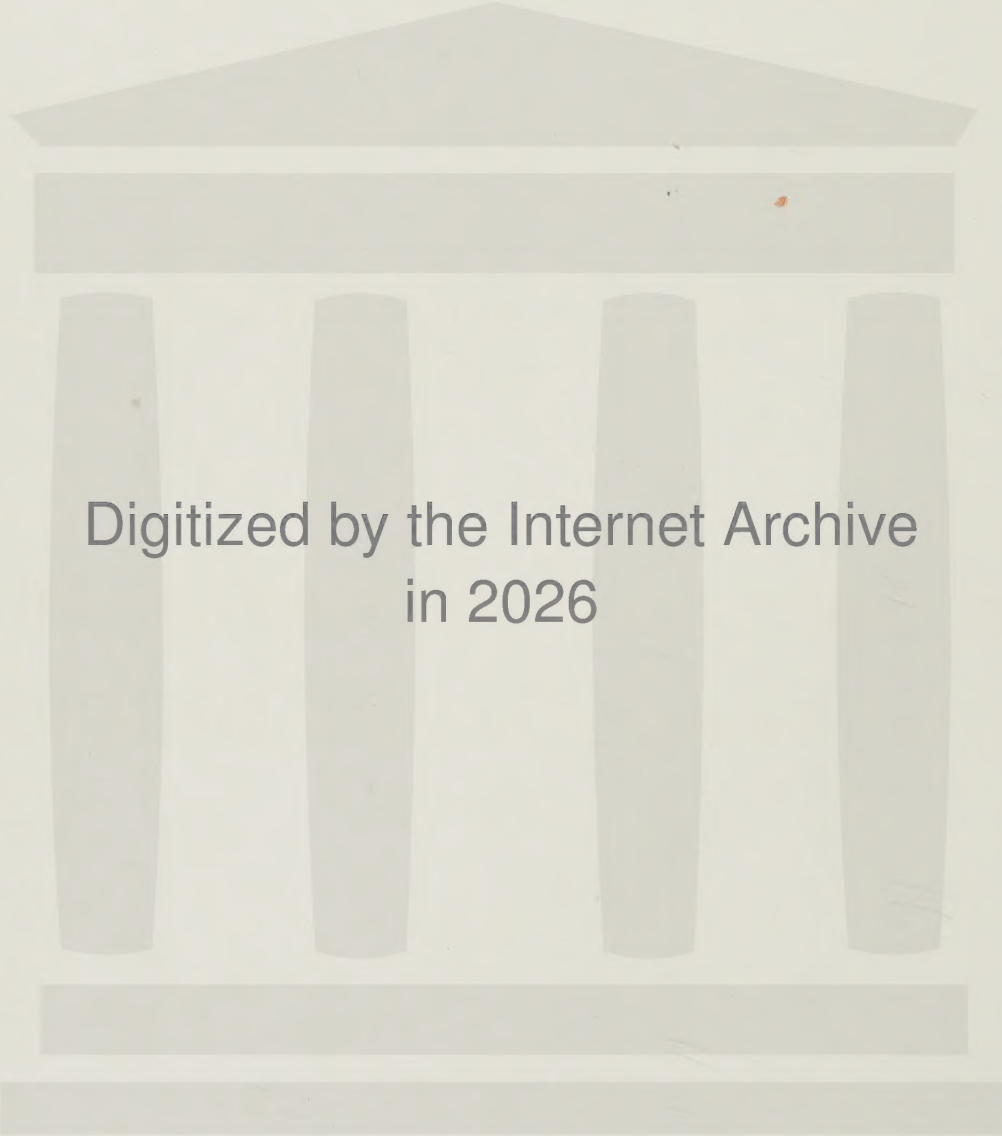


Soutenue le 13 Mai 1975 devant la Commission d'Examen

MM. J. ASSELINEAU
W. BERNHARD
P. JEANTEUR
K. SCHERRER
R. SIMARD
J.P. ZALTA

Président

Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546613_0007

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean Pierre BACHELLERIE

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE D'UNITES CHROMATINIENNES ACTIVEMENT TRANSCRITES



Soutenue le 13 Mai 1975 devant la Commission d'Examen

MM. J. ASSELINEAU
W. BERNHARD
P. JEANTEUR
K. SCHERRER
R. SIMARD
J.P ZALTA

Président

Examineurs

THÈSE

PRÉSENTÉE

À L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean Pierre BACHELLERIE

Attaché de Recherche au C.N.R.S.

ÉTUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE D'UNITÉS

CHROMATINIENNES ACTIVEMENT TRANSCRITES



Contenu de la thèse : 100-1000-100

Présenté par

Examiné par

MR. J. ASSELMAN
W. BERNHARD
P. HARTMAN
K. J. J. J. J.
R. J. J. J.
L. J. J. J.

UNIVERSITE PAUL SABATIER

TABLEAU DU PERSONNEL SCIENCES

DIRECTION DE L'UNIVERSITE

M. LARENG	Président
M. MATHIS	1er Vice-Président
M. MARTIN	2ème Vice-Président

U.E.R. SCIENTIFIQUES

HONORARIAT

M. BEDOS	Professeur honoraire
M. BLAIZOT	Doyen honoraire
M. CAPDECOMME	Doyen honoraire, Recteur honoraire correspondant de l'Institut
M. DIEHL	Professeur honoraire
M. DUPOUY	Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S., Professeur honoraire
M. DURAND Emile	Doyen honoraire
M. ESCANDE	Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. GAUSSEN	Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. JACQUES	Professeur honoraire
M. MASDUPUY	Professeur honoraire
M. MATHIS	Doyen honoraire
M. MIGNONAC	Professeur honoraire
M. MORQUER	Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT	Professeur honoraire
M. TEISSIE-SOLIER	Professeur honoraire
M. VANDEL	Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. DUPIN	Professeur honoraire

PROFESSEURS

M. CAPDECOMME	Minéralogie, Correspondant de l'Institut
M. GALLAIS	Chimie, Membre de l'Institut
M. DURAND Emile	Physique
M. FERT	Physique
M. LESBRE	Chimie Organique
M. HURON	Mathématiques Appliquées
M. MARGULIS	Pédologie
M. TRICHE	Chimie Analytique et Spectrographie
M. LEDOUX	Zoologie Appliquée
M. RIVALS	Agriculture
M. PERRIER	Physique
M. MATHIS	Chimie
M. ORLIAC	Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE	Physique
M. ANGELIER	Ecologie
Mlle de FERRE	Botanique
M. FARRAN	Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET	Physique Théorique et Calcul Numérique
M. SERFATY	Biologie Animale
M. LAGASSE	Electrotechnique
M. BLANC	Physique Nucléaire
M. LEREDDE	Botanique
M. LELUBRE	Géologie
M. LALAGUE	Mathématiques Générales
M. BOUIQUE	Astronomie
M. ASSELINEAU	Chimie Biologique
M. MAURET	Chimie Systématique
M. AGID	Physiologie
M. MONTANT	Cryptogamie
M. GAUTIER	Physique

M. CRUMEYROLLE	Mathématiques
M. GOURINARD	Géologie
M. PULOU	Minéralogie
M. CAMBOU	Physique Spatiale
M. LACOSTE	Electrotechnique
M. THIBAUT	Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MASCART	Mathématiques
M. MEDIONI	Psychophysiologie
M. RAYNAUD Pierre	Physiologie Animale
M. ZALTA	Chimie Biologique
M. SEVELY	Electrotechnique
M. POMMIEZ	Mathématiques
M. REY Paul	Biologie Végétale
M. COULOMB	Physique
M. TRINQUIER	Physique
M. MARONI	Chimie
M. BEETSCHEN	Biologie Générale
M. DERACHE	Physiologie Animale
M. SATGE	Chimie Organique
M. LATTES	Chimie
M. VEDRENNE	Géophysique
M. DURAND-DE LGA	Géologie
M. CARRARA	Physique
M. JEANNIN	Chimie Minérale
M. MAHENC	Chimie
M. MIROUZE	Géologie
M. BITSCH	Zoologie
M. DEGEILH	Physique
M. MARTIN J.C.	Génie Electrique
M. REY Gérard	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SICARD	Biologie Génétique
M. SOUQUET	Géologie

PROFESSEURS ASSOCIES

M. ANDERSON	Physique Spatiale
-------------------	-------------------

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. PICCA	Physique
M. MERIC	Mathématiques Appliquées
Mme LECAL	Zoologie
M. PILOD	Physique
M. LARROQUE	Physique
M. BARRANS	Chimie
Mlle LAPEYRE	Mathématiques - Informatique
M. BERTRAND	Chimie
M. DESQ	Mathématiques
M. ROCARD	Electronique
M. POILBLANC	Chimie
M. TOUZE	Physiologie Végétale
M. FRASNAY	Mathématiques
M. CASSAGNAU	Zoologie
M. GUERIN	Mathématiques
M. PESCIA	Physique
M. SCHNEIDER	Biologie Cellulaire
M. de LOTH	Chimie Physique
M. SAPORTE	Physique
M. PERENNOU	Informatique
M. THENOZ	Génie Civil
M. CAUSSINUS	Mathématiques Appliquées
M. DURAND Ph.	Physique
M. CASTAN	Informatique
M. REME	Mesures Physiques
M. FONTAN	Physique Nucléaire

M. BAUDRAS	Chimie Biologique
M. CALVET	Mécanique des Fluides
M. PAGANI	Physique
M. BEAUFILS	Informatique
M. BERTHELEMY	Zoologie
M. TERJANIAN	Mathématiques
M. COLETTE	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M. ATTEIA	Mathématiques
M. CUPPENS	Mathématiques
Mlle BARB ANCE	Mathématiques
M. VERDIER	Physique
M. GILLY	Génie Mécanique
M. COTTU	Génie Mécanique
M. ROUTIE	Génie Chimique
M. MARAL	Physique
M. HURAU	Physique
M. LEGRAND	Génie Civil
M. ABATUT	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SOTIROPOULOS	Chimie Organique
Mme GERVAIS	Chimie Inorganique
M. BONEL	Chimie
M. MAUSS	Mécanique
M. B ANCEL	Mathématiques
M. JOSSERAND	Mesures Physiques
M. BETOURNE	Informatique
M. CAMPAN	Psychophysiology
M. CLERC	Mécanique
M. GRIFONE	Mathématiques
M. ETTINGER	Mathématiques
M. LETAC	Mathématiques
M. BONNET Louis	Biologie
M. LOUARN	Génétique
M. BOUDET	Physiologie Végétale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M. BACCAR	Chimie Organique
-----------------	------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. PRADINES	Mathématiques
M. NGUYEN THANH VAN	Mathématiques
M. GALINIER Michel	Informatique

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. NOUGARO	Hydraulique Générale et Appliquée
M. GARDY	Génie Chimique
M. BIREBENT	Electronique Appliquée
M. VOIGT	Chimie Minérale
M. MONTEL	Chimie Physique et Electrochimie
M. THIRRIOT	Hydrodynamique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. GRUAT	Mécanique des Fluides (Hydraulique)
M. BUGAREL	Génie Chimique
M. DAT	Mécanique des Fluides
M. MARTY	Physique Industrielle

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HAMANT	Botanique
Mlle BERDUCOU	Physiologie Végétale
M. FALLOT	Biologie Végétale (Viticulture et Arboriculture)
M. TRUCHASSON	Mécanique
M. HOFFMANN	Electronique
M. ENJALBERT	Chimie
M. LEFEUVRE	Electronique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. ANGELINO	Génie Chimique
M. DABOSI	E.N.S.C.T.

MAITRES DE CONFERENCES

M. MATHIEU	Chimie Analytique
M. TRANNOY	Physique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. CASTAGNETTO	Mathématiques (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. GILOT	Génie Chimique (Institut du Génie Chimique)
M. CALMON	Techniques Agricoles
M. MATHEAU	Electronique

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. NOAILLES	Informatique
-------------------	--------------

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. ROQUES	Chimie Industrielle
M. GRATELOUP	Génie Electrique
M. MASO	Génie Civil
M. MIRA	Génie Electrique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. FAGET	Physique
M. DURAND Gilbert	Chimie
M. SCHUTTLER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M. LETURCO	Génie Electrique
M. SIRIEYS	Génie Civil
M. BROUSSEAU	Physique
M. BESOMBES-VAILHE	Chimie
M. VERDIER Alain	Chimie

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. LACAZE	Mathématiques
-----------------	---------------



ADMINISTRATION

M. PRINEAU	Secrétaire Général de l'Université
------------------	------------------------------------

A ma femme,

A mes Parents.

Le travail qui fait l'objet de cette thèse a été réalisé dans le laboratoire de Biochimie dirigé par Monsieur le Professeur ZALTA. Le domaine biologique m'était complètement inconnu à mon entrée dans le laboratoire et Monsieur ZALTA a pris, dans ma formation scientifique, une part essentielle, en particulier en me permettant de découvrir des modes d'approche et de raisonnement spécifiques de la recherche en biologie. Je le remercie pour son soutien constant et pour le temps qu'il m'a si généreusement consacré.

Je remercie Messieurs les Directeurs ASSELINEAU et BERNHARD, Messieurs les Professeurs JEANTEUR, SCHERRER et SIMARD, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir accepter de constituer le Jury de soutenance de thèse.

L'approfondissement des rapports structure-fonction sur le matériel biologique impliquait une approche pluri-disciplinaire des problèmes.

Une partie importante de ce travail -consacrée à l'étude ultra-structurale de l'appareil nucléolaire- a été effectuée en étroite collaboration avec le Professeur SIMARD, de l'Université de SHERBROOKE. L'étude de l'organisation des régions chromatinienne non nucléolaires a été entreprise grâce à l'intérêt et au soutien de Monsieur le Directeur BERNHARD, directeur du Laboratoire de Microscopie électronique de l'Institut de Recherche Scientifique sur le Cancer à VILLEJUIF, qui a permis le développement d'une collaboration avec le Docteur E. PUVION.

Que Monsieur le Professeur SIMARD et le Docteur PUVION soient ici remerciés de leur apport essentiel dans ce travail, tant du point de vue expérimental que par les nombreuses et fructueuses discussions qu'il m'a été donné d'avoir avec eux.

Il m'est agréable de remercier ici l'ensemble de l'équipe de Monsieur ZALTA : tous ont concouru par leurs discussions ou leur aide tech-

nique à la réalisation de ce travail. Tout particulièrement, je suis reconnaissant à Madame NICOLOSO pour l'efficacité, la ténacité et l'enthousiasme constants dont elle a su faire preuve tout au long d'expérimentations nombreuses et souvent délicates. Les fréquentes discussions avec F. AMALRIC m'ont été précieuses.

Je suis reconnaissant à l'ensemble du personnel des services généraux du Centre de Recherche de Biochimie et Génétique Cellulaires du C.N.R.S., de l'aide et de la compréhension qu'ils m'ont apportées au cours de la rédaction de cette thèse. Je remercie particulièrement Madame LECOINTE de sa collaboration dans la recherche bibliographique.

Madame MONNIN et Madame MARCOS ont eu la lourde tâche de réaliser, dans des délais très brefs, la frappe de ce mémoire. Je leur exprime toute ma gratitude pour leur efficacité et leur dévouement.

TABLE DES MATIERES

Introduction Générale	I
PREMIERE PARTIE	
<u>Chapitre I :</u>	
Etude préliminaire du matériel cellulaire utilisé	5
Introduction	6
I.Choix du matériel cellulaire.Conditions de culture et de marquage.	9
2.Fractionnement cellulaire :Isolement des nucléoles.	12
3.Etude en microscopie électronique des nucléoles isolés.	17
4.Caractéristiques biochimiques des nucléoles isolés.	20
5.Etude de l'ARN nucléolaire :	25
a)Techniques d'analyse	25
b)Etude cinétique du marquage de l'ARN nucléolaire	30
c)Discussion	32
Conclusion du chapitre	34
<u>Chapitre 2 :</u>	
Isolement et caractérisation des préribosomes nucléolaires	35
Introduction	36
I.Généralités	37
2.Description de la méthode de lyse des nucléoles par l'héparine.	41
a)Extraction des composants nucléolaires	41
b)Effet des conditions de lyse sur les ribosomes cytoplasmiques	44
3.Analyse des éléments extraits du nucléole	46
a)Détection en densité optique	47
b)Détection après marquage de l'ARN	49
4.Effet de l'ion Mg^{2+} sur la séparation des éléments sub-nucléolaires	51
5.Nature RNP des éléments contenant l'ARN préribosomique	54
a)Répartition des protéines nucléolaires	54
b)Effets de traitements enzymatiques sur la répartition des éléments extraits du nucléole	55

c) Mesure de la densité de flottation	58
d) Analyse par électrophorèse des protéines liées à 1'ARN préribosomique	60
6. Analyse ultrastructurale des RNPs nucléolaires isolées	64
Conclusion du chapitre	72
<u>Chapitre 3 :</u>	
Etude des phases précoces de l'élaboration des préribosomes nucléolaires.	73
Introduction	74
1. Mise en évidence d'éléments contenant 1'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé, distincts des RNPs de 80 S	75
2. Définition des conditions optima pour l'étude de ces élé- ments	78
3. Etude comparée d'un autre système de lyse des nucléoles	81
4. Dégradation in vitro de 1'ARN nucléolaire en cours de lyse	85
5. Analyse des éléments contenant 1'ARN précoce, en l'absence d'hydrolyse in vitro	89
a) Effet de l'ion Mn^{2+}	89
b) Emploi de milieux à haute force ionique	91
6. Etude biochimique des éléments contenant 1'ARN nucléolaire 45 S nouvellement synthétisé.	96
a) Nature RNP	98
1) Rétention sur filtre de nitrocellulose	98
2) Densité de flottation	100
b) Etude de 1'ARN 45S précoce	101
1) Recherche de segments poly(A) dans la molécule	102
2) Sensibilité à de faibles doses d'actinomycine D	103
3) Cinétique de méthylation de 1'ARN	106
4) Hybridation moléculaire avec 1'ADN nucléolaire	107
Conclusion du chapitre	111
<u>Chapitre 4 :</u>	
Origine et devenir des protéines nucléolaires. Etude préli- minaire	112
Introduction	113
1. Cinétique de marquage in vivo des protéines nucléolaires	117
2. Marquage continu in vitro. Expérience de "chasse"	118

3.Effet d'un blocage de la biosynthèse d'ARN sur le mar-	I23
quage des protéines nucléolaires	
4.Répartition des protéines nucléolaires nouvellement syn-	I25
thétisées	
5.Répartition après blocage de la biosynthèse d'ARN nuclé-	I30
olaire	
Conclusion du chapitre	I31
DEUXIEME PARTIE	I32
<u>Chapitre I :</u>	
Système acellulaire permettant un fonctionnement partiel de	I36
nucléoles isolés	
Introduction	I37
1.Transcription in vitro de l'ADN nucléolaire	I39
a)Cinétique d'incorporation en ARN	I40
b)Analyse des ARNs formés	I43
c)Discussion	I44
2.Maturation in vitro de l'ARN nucléolaire	I46
a)ARN peu mûré in vivo	I46
b)ARN plus mûré in vivo	I52
c)Discussion	I54
3.Exportation in vitro des ARNs nucléolaires	I56
Conclusion du chapitre	I60
<u>Chapitre 2 :</u>	
Isolement sélectif de divers constituants nucléolaires	I62
1.Extraction ménagée d'éléments nucléolaires par traite-	I63
ment par l'héparine	
2.Etude comparative des effets de deux systèmes de dissocia-	I69
tion du nucléole utilisés pour isoler les préribosomes	
Conclusion du chapitre	I73
<u>Chapitre 3 :</u>	
Dissociation progressive in vitro des nucléoles isolés.Etude	I75
biochimique	
Introduction	I76
1.Description du système de fractionnement	I78
2.Répartition de l'ARN nucléolaire	I82
3.Répartition de l'ADN nucléolaire	I84

4.Répartition des protéines nucléolaires	187
5.Analyse des éléments nucléolaires les plus dissociés (fraction S_{25}).	190
Discussion des résultats	196
<u>Chapitre 4 :</u>	
Dissociation progressive in vitro des nucléoles isolés.Etude ultrastructurale.	200
Introduction	201
1.Effet de l'ion Mg^{2+} sur les nucléoles isolés	202
2.Effet de la sonication,en fonction de la concentration en ion Mg^{2+}	206
3.Etude des fractions subnucléolaires isolées	208
Discussion des résultats	213
TROISIEME PARTIE	
Organisation ultrastructurale et caractérisation biochimique de complexes chromatine-RNPs isolés des régions non-nucléolaires du noyau.	215
Introduction	216
1.Description du mode de fractionnement	217
2.Etude ultrastructurale des complexes chromatine-RNPs isolés	220
3.Origine extra-nucléolaire de ces éléments	222
4.Analyse de l'ARN des complexes chromatine-RNPs ,	225
5.Fractionnement préliminaire des complexes chromatine-RNPs	228
a)Etude biochimique	228
b)Etude ultrastructurale	231
6.Autoradiographie ultrastructurale	237
Discussion des résultats	238
CONCLUSION GENERALE	242
BIBLIOGRAPHIE	247

INTRODUCTION

Les rapports entre activité fonctionnelle et organisation structurale de la chromatine ont été étudiés au niveau d'unités transcriptionnelles définies. Le nucléole de cellule de mammifères, système chromatinien spécialisé et hautement redondant pour les gènes ribosomiques pouvant être isolé dans des conditions favorables, a été choisi comme modèle d'étude d'un ensemble intégré au niveau duquel peuvent être suivis les processus de transcription et de maturation d'un ARN défini. La mise en évidence dans l'appareil nucléolaire d'éléments pouvant correspondre à des sous-ensembles d'organisation structurale et fonctionnelle, nous a conduit à étendre notre étude à la chromatine non-nucléolaire. Les premiers résultats sont en faveur de l'existence d'un type d'organisation général au niveau de toute unité chromatinienne activement transcrite.

Les multiples mécanismes qui interviennent, chez les eucaryotes, pour régler l'expression du génôme ne sont encore identifiés et caractérisés que d'une manière partielle. L'appréhension d'ensemble de ces processus de régulation reste difficile : le génôme eucaryotique est d'une complexité élevée et les contrôles possibles nombreux et interdépendants, se situent à des temps et dans des lieux intracellulaires différents.

Divers mécanismes de contrôle interviennent au stade de la transcription de l'ADN. Le nombre et la nature des gènes qui peuvent être transcrits sont limités vraisemblablement, pour chaque type cellulaire, par des protéines nucléaires et éventuellement d'autres facteurs (HEARST et BOTCHAN 1970). La possibilité qu'une synthèse d'ARN s'effectue au niveau de loci définis dans l'ADN semble contrôlée en effet, au moins en partie, par la structure du complexe chromatinien dans lequel est engagé l'ADN. Les protéines spécifiques de la chromatine, qu'elles soient de type histonique ou non-histonique, jouent un rôle essentiel dans le maintien ou les modifications de cette structure. La transcription de gènes définis peut elle-même varier en fonction des conditions physiologiques, en réponse à des variations du milieu nutritionnel, à l'effet d'antibiotiques ou à des actions hormonales (O'MALLEY et MEANS - 1974), selon l'état conformationnel de la chromatine et la disponibilité, au niveau de la matrice des divers substrats et des facteurs contrôlant l'activité catalytique de l'ARN polymérase.

L'expression de l'information génétique peut également être contrôlée au stade de la traduction, c'est-à-dire lors de la synthèse

protéique, au niveau des polysomes cytoplasmiques. Il apparaît notamment que l'utilisation de l'ARN messenger présent dans le cytoplasme, peut être modulée selon les besoins de la cellule, d'après son environnement ou son stade de croissance par l'intervention de mécanismes divers: Il a été montré que différents facteurs peuvent initier de façon spécifique la traduction préférentielle de certains types d'ARN messenger (STRYCHARZ, RANKI et MARCHER - 1973) ou contrôler la stabilité d'un ARN messenger bien défini (BUCKINGHAM et al. - 1974).

Enfin, un certain nombre de mécanismes post-transcriptionnels peuvent régler la production des ARNs directement fonctionnels dans la cellule, en intervenant dans la séquence de transferts intracellulaires et de réactions métaboliques qui permettent la transformation en un produit mûr de l'ARN venant d'être synthétisé (SCHERRER - 1973). Ces réactions concernent un ARN lié de façon spécifique et non-covalente à un nombre élevé de protéines et intégré dans des complexes supramoléculaires. Dans le noyau, les éléments RNPs ultrastructuralement définis s'organisent topographiquement d'une manière caractéristique (MONNERON et BERNHARD - 1969), et on peut penser que ce type d'organisation est relié étroitement aux événements fonctionnels qui conduisent à la maturation de l'ARN nouvellement synthétisé.

POUR NOTRE PART, NOUS AVONS ENTREPRIS DE PRECISER CERTAINS ASPECTS DE L'ORGANISATION FONCTIONNELLE DE REGIONS CHROMATINIENNES ACTIVEMENT TRANS-CRITES ET PLUS PARTICULIEREMENT D'ETUDIER QUELLES RELATIONS PEUVENT EXISTER DU POINT DE VUE STRUCTURAL ET FONCTIONNEL, ENTRE CETTE CHROMATINE ET LES ELEMENTS QUI CONTIENNENT LES ARNs VENANT D'ÊTRE SYNTHETISES ET EVENTUELLEMENT CEUX QUI SONT EN COURS DE MATURATION.

Dans le cas général de la chromatine nucléaire, l'expression simultanée d'un nombre élevé de gènes différents a pour effet de soumettre cette approche à des limitations d'ordre technique, dues à la difficulté d'isoler une fraction de chromatine contenant un gène défini et le produit initial de sa transcription. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'étudier un système chromatinien spécialisé dont l'organisation structurale et temporelle est déterminée de façon précise, le nucléole de cellules de mammifères. Cet appareil chromatinien présente l'avantage de constituer un ensemble fonctionnel intégré au niveau duquel la transcription d'un nombre élevé de gènes identiques et les modifications post-transcriptionnelles d'un ARN bien défini, l'ARN ribosomique (PERRY - 1967), peuvent être reliées à une organisation ultrastructurale particulière de la chromatine qui contient les gènes codant pour cet ARN. GRANBOULAN et GRANBOULAN (1965), en mettant en oeuvre des techniques d'autoradiographie à haute résolution,

avaient montré, par observation du nucléole *in situ*, que les zones nucléolaires où se localise l'ARN qui vient d'être synthétisé, possèdent une organisation ultrastructurale caractéristique, du point de vue de l'arrangement de divers types, morphologiquement définis, de chromatine et d'éléments RNP. Cependant, les informations qu'il est possible d'obtenir sur un système observé dans la cellule entière restent limités. Nous avons donc entrepris de définir des techniques de fractionnement cellulaire, permettant une étude fine de l'appareil nucléolaire isolé. A partir d'une méthode conduisant à l'isolement de nucléoles dont l'organisation architecturale et les composants moléculaires sont bien préservés, nous avons mis au point divers moyens physicochimiques conduisant à une dissociation contrôlée des structures nucléolaires et pouvant permettre ainsi d'isoler et de caractériser des éléments dont les associations mutuelles, au niveau supra-moléculaire, ont été conservées à des degrés variables. Il importe, en premier lieu, d'identifier les éléments nucléolaires contenant l'ARN venant d'être synthétisé. Outre différents types de RNP nucléolaires décrites précédemment par d'autres auteurs, et dont la caractérisation biochimique et ultrastructurale a permis de préciser la place dans le processus de maturation de l'ARN préribosomique, nous avons mis en évidence une espèce RNP, non encore décrite, dans laquelle est intégré l'ARN immédiatement après sa synthèse. Ce type de RNP, à courte durée de vie, correspond à un état pré-curseur des autres éléments nucléolaires préribosomiques, déjà connus. La caractérisation de cette séquence d'événements fonctionnels, correspondant à la synthèse et la maturation de l'ARN préribosomique, a été couplée à la recherche d'informations concernant l'organisation ultrastructurale de l'ensemble de l'appareil nucléolaire. Cette approche a impliqué la mise en oeuvre conjointe de différents noyaux expérimentaux : définition de méthodes d'extraction sélective de constituants nucléolaires bien déterminés appliqués aux nucléoles isolés, utilisation d'un système acellulaire permettant un fonctionnement nucléolaire partiel et, enfin, la mise au point d'un système de dissection physicochimique des nucléoles isolés, par des études corrélatives biochimiques et ultrastructurales. Nous avons pu obtenir la séparation de constituants subnucléolaires, caractérisables du point de vue fonctionnel et topographique. Nous avons isolé en particulier des associations complexes entre chromatine et RNP où sont reconnaissables les formes d'organisation native au niveau desquelles se localise *in situ* l'ARN nucléolaire nouvellement transcrit. Ces éléments peuvent correspondre à des sous-ensembles d'organisation de l'appareil nucléolaire.

Le système nucléolaire peut, de par ces caractéristiques intrinsèques, constituer un cas particulier de fonctionnement chromatinien : il se distingue en effet par la nature et le rôle particulier de l'ARN qui y est synthétisé, par l'intervention d'une ARN-polymérase spécifique et surtout par le degré important de redondance des gènes qui y sont transcrits. Cependant, la mise en évidence de sous-ensembles dans l'organisation nucléolaire et les résultats d'études ultrastructurales du noyau *in situ* (MONNERON et BERNHARD - 1969) laissent penser qu'il peut exister aussi au niveau de la chromatine non-nucléolaire, des unités structurales pouvant correspondre à des unités fonctionnelles et présentant un type d'organisation homolo-

gue de celui qui confère au nucléole sa structure particulière. C'est cette hypothèse que nous avons entrepris d'examiner en abordant l'étude de l'organisation des régions chromatinien-nes non-nucléolaires activement transcrites. Dans les conditions physicochimiques qui permettent une bonne préservation de l'appareil nucléolaire, nous avons pu isoler de la chromatine non-nucléolaire des structures complexes qui ont conservé une organisation supra-particulière analogue à celle qui peut être observée in situ dans des zones nucléaires définies.

En particulier, l'association d'espèces RNP morphologiquement caractérisées in situ, à savoir fibrilles et grains péri-chromatiniens, avec des régions chromatinien-nes caractéristiques, est préservée. Par autoradiographie à haute résolution, nous avons pu établir que les fibrilles péri-chromatiniens représentent l'état morphologique de l'ARNHn nouvellement synthétisé.

Nous pouvons donc actuellement isoler, à la fois de la chromatine nucléolaire et de la chromatine non-nucléolaire des fractions chromatinien-nes définies, organisées selon des schémas topographiques caractéristiques, en association avec des RNBs contenant l'ARN nouvellement synthétisé. La caractérisation de ces éléments, l'étude de leurs arrangements mutuels, au niveau moléculaire, peuvent permettre de définir un schéma général de l'organisation d'unités chromatinien-nes activement transcrites.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

ETUDE PRELIMINAIRE DU MATERIEL CELLULAIRE UTILISE

INTRODUCTION

Le nucléole, appareil chromatinien particulier chez les eucaryotes, est le site de la biosynthèse et de la maturation des ARNs ribosomiques. L'ARN ribosomique est synthétisé sous forme de précurseur à haute masse molaire, de type 45S chez les mammifères, puis subit, dans le nucléole, une série de coupures spécifiques, catalysées par des nucléases, qui conduisent à la formation des molécules de 28 et 18S, retrouvées ultérieurement dans les ribosomes cytoplasmiques. Tout au long des réactions de maturation, l'ARN préribosomique, lié à des protéines spécifiques, se trouve intégré dans des complexes RNPs dont l'organisation ultrastructurale dans l'appareil nucléolaire apparaît étroitement reliée à l'état fonctionnel.

Du fait de sa structure particulière et de sa présence générale dans les cellules eucaryotes, le nucléole a été étudié depuis longtemps (MONTGOMERY - 1898). Cependant, son rôle central dans la biosynthèse du ribosome n'a pu être établi que récemment, par le développement des méthodes de biologie moléculaire.

1. Données biochimiques.

*Par une combinaison d'approches biochimiques et génétiques il a pu être démontré que le matériel génétique responsable de la formation du nucléole contient les séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique. A cet égard, les travaux de BROWN et GURDON (1964) et de BIRNSTEIL et al. (1966) portant sur des mutants anucléolés ou possédant un nombre croissant de nucléoles, chez *Xenopus laevis*, et ceux de RITOSSA et al. (1965), sur les mutants "bobbed" de *Drosophila melanogaster*, ont constitué un apport décisif.*

Le produit de la transcription des cistrons ribosomiques au niveau du nucléole est un ARN de haute masse molaire, précurseur de l'ARN des ribosomes cytoplasmiques. La présence, dans le nucléole des cellules de mammifères, d'un ARN de 45S, relativement instable, a d'abord été mis en évidence par PERRY et par SCHERRER et al. (1962), et son rôle de précurseur de l'ARN ribosomique a été montré par des expériences de chasse par l'actinomycine (PERRY -1962- et SCHERRER et al.-1963-). Les techniques d'hybridation moléculaire ont permis de montrer la présence, dans la molécule du précurseur

45 S des séquences des ARNs ribosomiques cytoplasmiques de 28 et 18S et ont mis en évidence la redondance des cistrons ribosomiques dans l'ADN nucléolaire (RITOSSA et al. 1968 ; QUAGLIAROTTI et al. 1970).

Outre les séquences des ARNs de 28 et 18S, la molécule de 45S contient en proportion élevée (de 40 à 50 %) des séquences qui ne sont pas conservées au cours de la maturation. Une étude comparative (PERRY -1970-) a montré que, au cours de l'évolution, la taille de ces séquences a cru dans des proportions plus importantes que celle des ARNs des ribosomes cytoplasmiques (LOENING - 1968-). De plus, la structure primaire de ces séquences "extra-ribosomiques" a divergé beaucoup plus nettement que celle des ARNs 28 et 18S (AMALDI -1969 - BROWN et al -1972-), sans qu'apparemment ces variations affectent notablement leur rôle fonctionnel. Les séquences "extra-ribosomiques" se caractérisent en outre par une teneur globale en bases (G + C) plus élevée (voir revue par BUSCH et SMETANA -1970) et par l'absence de méthylation des groupements ribose qui se limite aux séquences 28 et 18S (voir revue par SALIM et MADEN -1973-). Les séquences extra-ribosomiques peuvent jouer un rôle important dans le contrôle de l'élaboration des ribosomes (MIRAULT et SCHERRER -1972-). L'arrangement des divers types de séquences dans la molécule d'ARN précurseur a pu être établi avec précision par différentes approches : analyse des groupements terminaux (CHOI et BUSCH -1970-), analyse séquentielle directe de fragments résultant d'hydrolyses spécifiques, par fingerprinting (MADEN et SALIM-1974-) ou encore par des études cinétiques courtes du marquage des molécules d'ARN préribosomique (HADJIOLOV et MILCHEV -1974-). Les conclusions de ces divers travaux sont en accord avec les résultats de l'étude ultrastructurale directe, en microscopie électronique, des divers types d'ARNs ribosomiques; dans cette étude (WELLAUER et DAWID -1973-), des régions possédant une structure secondaire caractéristique et de localisation bien définie, ont servi de repères topologiques sur les différents types de molécules d'ARN. L'existence du phénomène d'amplification génique et le développement de méthodes biochimiques permettant d'isoler, chez les oocytes de *Xenopus laevis*, un ADN satellite hautement purifié contenant les cistrons ribosomiques, a permis de préciser leur arrangement mutuel. Les gènes ribosomiques répétés se répartissent régulièrement le long de la molécule d'ADN et sont séparés par des segments non transcrits, ou "spacers" (BIRNSTIEL et al. -1968- BROWN et al.-1968- DAWID et al.-1970-). Les études morphologiques directes, au niveau ultrastructural, des processus de transcription (MILLER et al.-1972-) ont confirmé ces conclusions.

La synthèse de l'ARN préribosomique est catalysée dans le nucléole par une ARN-polymérase spécifique (ROEDER et RUTTER -1970-). L'ARN préribosomique 45S subit dans le nucléole une série de clivages catalysés par des endo- et exonucléases (LIAU et al.-1968- KELLEY et PERRY -1971- MIRAULT et SCHERRER -1972- WINICOV et PERRY -1974-). Plusieurs espèces moléculaires d'ARN de taille discrète, produites par ces réactions de maturation, peuvent être détectées dans le nucléole : formes 41S, 32S, 24S et 20S, en plus des formes nucléolaires les plus maturées de 28 et 18S, très analogues aux ARN₅ des ribosomes cytoplasmiques.

Outre les ARNs préribosomiques de haute masse molaire, des ARNs à faible masse molaire sont présents dans le nucléole, leurs vitesses de sédimentation variant entre 4 et 7S. La plupart d'entre eux diffèrent des ARNs préribosomiques à haute masse molaire par leur taux de renouvellement, leur composition en base ou leur réponse à l'action d'antibiotiques (voir revue par BUSCH et SMETANA -1970-). Cependant, un ARN de type 7S (PENE et al. -1968-) est produit au cours des clivages de l'ARN précurseur ribosomique: il est stable, se lie de façon non covalente à l'ARN 28S dans le nucléole et se retrouve dans la sous-unité 60S des ribosomes cytoplasmiques. D'autre part, un ARN de type 5S, synthétisé indépendamment de l'ARN préribosomique (PERRY et al. -1968-) dans les régions non-nucléolaires du noyau (LEIBOWITZ et al. -1973-), est transféré dans le nucléole sous forme de RNPs qui sont rapidement intégrés dans les RNPs nucléolaires contenant l'ARN 45S (AUGER et TIOLLAIS -1974-).

Les ARNs préribosomiques de type 45 et 32S peuvent être extraits du nucléole sous forme de particules RNPs respectivement de 80 et 55S (WARNER et SOEIRO -1967- LIAU et PERRY -1969- MIRAULT et SCHERRER -1971- BACHELERIE et al. -1971-) contenant un nombre élevé d'espèces protéiques. Certaines de ces protéines se retrouvent ultérieurement dans les ribosomes cytoplasmiques, tandis que d'autres ne restent liées à l'ARN préribosomique que devant les étapes intra-nucléolaires de maturation. (KUMAR et WARNER -1972-).

2. Données Ultrastructurales

Divers procédés de cytochimie ultra-structurale ont permis d'aborder l'étude de l'organisation macromoléculaire du nucléole (voir revue par BERNHARD -1966-). Quatre types majeurs d'éléments nucléolaires ont été caractérisés : des RNPs de type granulaire, ressemblant aux ribosomes cytoplasmiques, mesurant environ 150 Å de diamètre, des RNPs de type fibrillaire d'environ 50 Å de diamètre et 300 à 400 Å de longueur, inclus dans une matrice protéique diffuse (MARINCOZZI -1964-), enfin, de la chromatine associée, formant une coque autour du nucléole (chromatine périnucléolaire) et se prolongeant à l'intérieur du corps nucléolaire (chromatine intranucléolaire), (GRANBOULAN et GRANBOULAN -1964-). Ces techniques cytochimiques, utilisées en association avec l'autoradiographie à haute résolution, ont permis d'établir que l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé, est localisé dans les RNPs de type fibrillaire avant d'être retrouvé sous forme de RNP granulaire (GRANBOULAN et GRANBOULAN -1965-). Le temps nécessaire à l'apparition du marquage au niveau des granules nucléolaires correspond sensiblement à celui qui a été déterminé par d'autres méthodes pour la transformation d'ARN 45S en molécules plus courtes.

Parmi l'ensemble des données qui viennent d'être résumées, certaines -en particulier celles qui portent sur la caractérisation des préribosomes nucléolaires et sur les processus de maturation- n'ont été précisées ou acquises qu'après que ce travail ait été engagé. Une analyse bibliographique plus complète en sera présentée, parallèlement à l'exposé de nos résultats sur ces problèmes, dans la première partie de cette thèse.

Outre sa spécialisation fonctionnelle, le système chromatinien nucléolaire présente l'avantage de pouvoir être isolé dans des conditions relativement satisfaisantes. Il est donc possible d'envisager une étude d'ensemble in vitro d'un appareil structuré, contenant à la fois des gènes transcrits bien caractérisés et leurs produits de transcription et intermédiaires de maturation, en vue de préciser son organisation.

A partir d'une technique d'isolement de nucléoles qui permet de préserver les caractéristiques biochimiques et ultrastructurales essentielles de cet organelle, nous avons entrepris de préciser certains aspects de l'organisation du système nucléolaire, et en particulier, des relations des régions chromatiniennes activement transcrites avec les produits de leur transcription.

Dans la première partie de cette thèse, nous définirons successivement le matériel cellulaire étudié, les techniques de fractionnement cellulaire qui ont été mises en oeuvre, et les caractéristiques des nucléoles isolés. Nous décrirons ensuite les techniques d'isolement mises au point pour l'étude des RNPs nucléolaires, en particulier ceux qui contiennent l'ARN nouvellement synthétisé, ainsi que les résultats de leur caractérisation.

I. CHOIX DU MATERIEL CELLULAIRE. CONDITIONS DE CULTURE ET DE MARQUAGE

Pour étudier le nucléole et les processus intranucléolaires, il est important de disposer de cellules qui peuvent être obtenues en grande quantité et qui possèdent une activité nucléolaire élevée (permettant donc un marquage facile par incorporation de précurseurs radioactifs). Enfin, la présence de nucléoles relativement volumineux peut faciliter leur isolement.

Certaines cellules transformées répondent à ces exigences. Au cours de notre étude, deux types cellulaires ont été principalement utilisés. Initialement, notre choix s'est porté sur une souche d'hépatome du rat (hépatome ascitique de Zajdela) qui présente notamment l'avantage de pouvoir être cultivée en masse dans des conditions relativement faciles (croissance sur l'animal, sous forme ascitique dans la cavité intrapérito-

néale). Par la suite, et en fonction des expérimentations envisagées, il s'est avéré nécessaire d'utiliser une souche cellulaire pouvant se développer in vitro dans des milieux liquides synthétiques, Nous avons choisi une souche de cellules de hamster, dite CHO (Chinese Hamster Ovary); dans certains cas, la souche Hela, d'origine humaine, a été étudiée.

a) Hépatome.

Les cellules d'hépatome ascitique de Zajdéla (ZAJDELA -1963-) proviennent d'une lignée établie à partir d'un hépatome solide obtenu par action d'un cancérigène chimique. En suspension dans un liquide ascitique, ces cellules se développent rapidement chez l'animal. La souche peut être conservée in vitro dans l'azote liquide.

1 ml de fluide ascitique (environ 10^7 cellules) prélevé sur un animal est injecté intrapéritonéalement à des rats femelles Wistar d'environ 175 g. En fonction du développement de l'ascite, le prélèvement est effectué le 3e ou 4e jour. En moyenne, 20 à 25 ml de suspension cellulaire peuvent alors être recueillis. Cette suspension est diluée avec du milieu salin d'Earle (1943) et les cellules sont décantées par centrifugation à 400 g puis lavées trois fois par le milieu d'Earle de façon à éliminer exhaustivement le liquide ascitique et les hématies qu'il peut contenir. Les culots cellulaires d'hépatome (en général 1 ml soit environ 3.10^8 cellules) sont conservés à -80°C jusqu'au moment du fractionnement cellulaire. Les marquages in vivo sont effectués par injection intrapéritonéale du précurseur radioactif dans le rat.

Quand des expériences de marquage in vitro par des précurseurs radioactifs sont envisagées, les cellules prélevées du rat sont lavées plusieurs fois avec le milieu minimum essentiel (M.E.M.) de EAGLE (1959) complémenté avec 2,95 g/l de Tryptose-phosphate Broth (Difco), 2 g/l de

D-glucose et 10 % de sérum de veau non dialysé. Ce milieu, stérilisé par filtration sur membrane de nitrocellulose (MILLIPORE HA 0,45 μ m) contient 60 mg/l de pénicilline, 90 mg/l de streptomycine et 30 000 U/l de mycostatine. La suspension (concentration moyenne: 5×10^5 cellules/ml) est ensuite placée dans des spinners -récipients cylindriques en verre munis d'un système d'agitation par entraînement magnétique- et incubée à 37°C. Ces conditions peuvent permettre pendant 48 heures, un développement cellulaire continu avec un temps de doublement proche de celui observé in vivo sur l'animal (18-20 heures). Les expériences de marquage sont effectuées 6 à 7 heures après la mise en culture in vitro, certaines perturbations métaboliques pouvant intervenir dans les premières heures qui suivent le transfert de milieu (WATSON 1966).

Ultérieurement, nous avons constaté que l'utilisation du milieu de Fischer (1958), moins concentré en ion phosphate que le milieu de Eagle permet aussi d'obtenir plusieurs doublements de la population cellulaire, mais avec une reproductibilité meilleure et des taux de synthèse généralement plus élevés. Dans ce cas, les cellules sont cultivées en suspension dans des flacons de verre et en l'absence d'agitation. L'utilisation de cette technique a été généralisée pour les divers marquages de cellules d'hépatome.

Dans tous les cas, les incorporations de précurseurs marqués sont arrêtées par dilution de la prise de suspension cellulaire dans un grand volume de solution Earle glacée, contenant des glaçons de la même solution. Les cellules sont ensuite recueillies par 5 minutes de centrifugation à 400 g et lavées par remise en suspension du culot dans la solution d'Earle glacée.

b) Cellules de Hamster (CHO).

L'utilisation des cellules d'hépatome ascitique présente certaines limites :

- le développement de la souche et, par suite, certaines de ses caractéristiques biochimiques sont dépendantes de l'état physiologique de l'animal;
- les expérimentations envisageables in vivo sont réduites du fait du phénomène naturel de "chasse" du marquage dû à la rapide dilution des précurseurs radioactifs dans tout l'animal qui intervient peu après leur injection dans la cavité intrapéritonéale, ce qui a pour effet de compliquer l'interprétation des résultats;
- les expérimentations effectuées in vitro, après transfert dans un milieu synthétique, ne peuvent être que courtes puisque les conditions utilisées ne permettent pas une culture cellulaire permanente;
- les données biochimiques acquises dans ces conditions ne peuvent être actuellement rapportées à des informations sur la génétique de ce système cellulaire.

C'est pourquoi nous avons entrepris d'étendre notre étude à un matériel cellulaire pouvant être cultivé in vitro de façon continu et ne présentant pas les inconvénients qui viennent d'être mentionnés. Nous avons choisi la souche CHO pour sa stabilité génétique qui a permis le développement récent d'études nombreuses conduisant à l'isolement de divers mutants.

Cette souche de CHO, fournie par le Dr. L. SIMINOVITCH, de TORONTO, peut être cultivée en falcon ou en spinner, maintenue entre 3 et $6 \cdot 10^5$ cellules/ml, dans le milieu minimum essentiel de Eagle (EUROBIO) complé-
menté avec 60 mg/l de pénicilline, 50 mg/l de streptomycine et 10 % de sérum de veau. Après marquage en spinner, les cellules sont recueillies comme décrit précédemment pour l'hépatome ascitique.

Les diverses techniques de fractionnement cellulaire (isolement de noyaux, nucléoles ou préribosomes nucléolaires), initialement mises au point sur la souche d'hépatome ascitique ont pu être appliquées à la souche CHO, moyennant quelques adaptations très mineures.

A l'occasion d'expérimentations particulières, d'autres souches cellulaires ont pu être utilisées, que ce soit du fait de caractéristiques biochimiques particulièrement intéressantes pour une étude donnée, ou pour servir de références avec des travaux d'autres auteurs (cellules Hela).

2. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE: ISOLEMENT DES NUCLEOLES .

Pour entreprendre une étude fine du système chromatinien nucléolaire, il importait, en premier lieu, de mettre au point des techniques de

fractionnement cellulaire permettant d'isoler cet organelle dans des conditions préservant ses caractéristiques biochimiques et ultrastructurales essentielles, en l'absence de contaminations significatives par de la chromatine extra-nucléolaire. Cet objectif a pu être atteint par la définition, dans le laboratoire (ZALTA et al.-1971-), d'une méthode dans laquelle la rupture des noyaux isolés est obtenue par sonication à basse force ionique, en l'absence de saccharose et présence de ficoll.

a) Introduction.

Par examen en microscopie électronique d'une préparation de nucléoles isolés selon des techniques classiques, il est possible de reconnaître trois types de chromatine : la chromatine intranucléolaire, la chromatine périnucléolaire à structure condensée, de type hétérochromatine, et des fractions, présentes en quantités variables selon les techniques utilisées, pouvant provenir soit de la fragmentation de nucléoles, soit de chromatine extranucléolaire (voir revue par BUSCH et SMETANA -1970-).

Par la technique de NAKAMURA et al. (1967) initialement utilisée dans le laboratoire, l'ADN retrouvé associé au nucléole, représente environ 1/10e de l'ADN nucléaire total. Cependant, la présence dans les fractions nucléolaires de noyaux non ouverts ou de fragments chromatinien non-nucléolaires, peut affecter notablement l'interprétation des résultats. Nous avons donc été amenés à mettre au point des techniques d'isolement permettant de réduire à un taux très faible la contamination par la chromatine extra-nucléolaire.

b) Isolement des nucléoles.

La technique mise au point dans le laboratoire (ZALTA et al. 1971-) où les noyaux sont dissociés par sonication à basse force ionique, dans un milieu contenant l'ion Mg^{++} et du ficoll, permet d'isoler avec un rendement

élevé des nucléoles dont l'intégrité ultrastructurale apparaît bien préservée et qui sont dépourvus de contaminations extra-nucléolaires. C'est pour obtenir que les constituants macromoléculaires essentiels de cet organelle lui restent associés au terme des processus d'isolement, que nous avons choisi d'utiliser des milieux à faible force ionique qui permettent la préservation des associations complexes entre acides nucléiques et protéines spécifiques.

La dispersion fine de la chromatine extra-nucléolaire qui peut être obtenue lors de la sonication, est favorisée par la présence de ficoll qui évite la formation de fibres épaisses de chromatine, difficiles à séparer des nucléoles. La viscosité des solutions de ficoll utilisées est équivalente à celle d'une solution 0,3 M en saccharose; cette concentration en ficoll n'induit pas de gonflement des nucléoles. D'autre part, la présence constante d'un ion divalent à une concentration définie est essentielle au maintien des structures nucléolaires. De faibles variations dans la concentration en Mg^{++} de l'ordre de 0,2 mM, peuvent entraîner des modifications morphologiques notables, que le nucléole soit isolé (BACHELLERIE et al.-1975b) ou qu'il soit observé dans un noyau isolé (ZALTA et al.-1973-). Une concentration minimum de 3 mM en Mg^{++} s'est avérée nécessaire pour une bonne préservation des structures nucléolaires au cours de l'isolement.

Si, avant sonication, la concentration en ion Mg^{++} de la suspension de noyaux est ramenée à une valeur inférieure à 1,5 mM, le nucléole observé en microscopie à contraste de phase apparaît moins dense, moins réfringent. Il présente alors une structure hétérogène avec alternance de zones claires et de grains très réfringents. Cet effet est d'autant plus marqué que la concentration en Mg^{++} est plus basse. Si la sonication est effectuée dans ces conditions, les nucléoles libérés se fragmentent aussitôt et ne peuvent être isolés.

D'autre part, cette concentration de 3 mM en ion Mg^{++} est suffisamment basse pour permettre une bonne dispersion du nucléoplasme et de la chromatine extra-nucléolaire.

La sonication de la suspension nucléaire est effectuée en deux temps : la première étape est réalisée en présence d'une concentration relativement élevée en ion Mg^{++} (5,5 mM), ce qui a pour effet de rompre avec efficacité et de façon homogène les fibres de chromatine non-nucléolaire. Cette chromatine est ensuite dispersée plus finement, dans la deuxième étape, en présence d'une concentration plus faible en ion Mg^{++} (3 mM); puis, les nucléoles sont isolés de la suspension par centrifugation différentielle.

Mode opératoire :

Dans la première phase de fractionnement, c'est-à-dire l'isolement de noyaux purifiés, la technique mise au point par ZALTA et al. (1962) basée sur l'emploi de détergents non ioniques, a été utilisée.

Les ARN nucléaires à masse molaire élevée s'étant révélés très sensibles à l'action de RNAases in vitro en cours de fractionnement, des précautions supplémentaires ont été prises pour préserver l'intégrité de ces molécules : contrôle strict de la température à toutes les étapes du fractionnement (2-3°C), rapidité maximum pour sa mise en oeuvre, stérilisation préalable de la verrerie par autoclavage (pour dénaturer d'éventuelles traces de RNAase exogène) prétraitement des différents tampons par un inhibiteur puissant de RNAase, le di-éthyl-pyrocarbonate (D.E.P.C.).

Préparation des noyaux :

3.10^8 cellules (un culot de 1 ml) sont remises en suspension dans 10 ml de milieu N saccharose 0,25 M; Tris-HCl 10^{-2} M, pH 7,4 ; $MgCl$ 2,5 mM; $CsCl_2$ 0,1 mM ; Polyvinyl-sulfate de potassium 20 µg/ml (Ce dernier produit, PVS, est utilisé comme inhibiteur de RNAase tout au long du fractionnement).

Après homogénéisation à la pipette de la suspension cellulaire, sont ajoutés 0,5 % (v/v) de Cémulsol NPT 10, 0,1 % (v/v) de Célanol 251 et 0,5 mg/ml de collagénase (Bacterial B grade, Calbiochem). La collagénase en solution dans du milieu N, a été préalablement débarrassée des débris bactériens qu'elle contenait par centrifugation (5 minutes à 600 g) puis filtration sur nitro-cellulose (Millipore HA 0,45 μ).

Le Cémulsol NPT 10 (Melles-Bezons), tensio-actif non ionique, est un nonylphénol-poly^{oxy}éthyléné à 10 molécules d'oxyde d'éthylène. En association avec la collagénase, il provoque une dissolution et une dispersion de la membrane cellulaire, tandis que le Célanol 251 (NPT 10 partiellement sulfaté) agit sur la membrane externe du noyau, permet de la débarrasser des polysomes qui lui sont attachés et facilite la rupture des noyaux dans les phases ultérieures.

La suspension cellulaire est homogénéisée au moyen d'un ULTRA-TURRAX (Janke et Kunkel) fonctionnant à vitesse réduite (entre 5.000 et 10.000 tours/minute). Chaque préparation est contrôlée au microscope à contraste de phase, au fur et à mesure de l'homogénéisation, qui est poursuivie jusqu'à ce que toutes les cellules soient ouvertes, sans que les noyaux n'apparaissent lésés. Au bout de 3 minutes d'homogénéisation environ, ce résultat est généralement atteint, les noyaux apparaissant libres de débris cytoplasmiques importants à l'examen par microscopie électronique. Selon le type de cellules étudiées, la vitesse et durée d'homogénéisation nécessaires peuvent être légèrement modifiées.

Les noyaux ainsi libérés sont recueillis par 5 minutes de centrifugation à 160 g dans des tubes de verre coniques. Après élimination du surnageant par aspiration, le culot de noyaux est remis en suspension dans 10 ml de milieu N, sans tensio-actifs ni collagénase. Après une nouvelle étape d'homogénéisation à l'Ultra-Turrax pendant une minute, la suspension est recentrifugée 5 minutes à 450 g. Les noyaux apparaissent alors dépourvus de contaminations cytoplasmiques.

Isolement des nucléoles :

Le culot de noyaux purifiés est remis en suspension des 12 ml de milieu A (Ficoll 2,1 % (p/v)); Tris HCl 10 mM, pH 7,4 ; MgCl₂ 5,5 mM ; - Mercaptoéthanol 0,25 mM; PVS 20 μ g/ml). La suspension est soumise à l'action d'oscillations soniques (appareil RAYTHEON DF 101, fréquence 10 kilocycles, puissance 200 W) dans un tube en polypropylène de 50 ml, pendant 90 secondes par impulsion de 10 secondes (avec des intervalles de 20 secondes). L'appareil est réfrigéré par une circulation continue d'éthanol

à - 15°C de telle façon qu'à aucun moment la température de la suspension ne dépasse 4°C. Après ce premier stade de sonication, tous les noyaux sont brisés et les nucléoles apparaissent soit libres, soit encore liés à des agrégats de chromatine non-nucléolaire. Après réduction de la concentration en ion Mg^{++} de la suspension à 3 mM (par addition de 12 ml de milieu B, de même composition que A, sauf pour $MgCl_2$: 0,5 mM), une dispersion plus complète de la chromatine est obtenue par une nouvelle série de sonications (90 secondes comme précédemment). Les nucléoles apparaissent alors libres de tout débris extra-nucléolaire. Ils peuvent être séparés des fines mottes de chromatine qui sont présentes dans la suspension par centrifugation différentielle, du fait de leur vitesse de sédimentation largement supérieure. Après 5 minutes de centrifugation à 450 g dans des tubes coniques, les nucléoles sont recueillis sous forme de culot, après décantation du surnageant par aspiration. Ils sont ensuite lavés par remise en suspension dans 5 ml de milieu TMK (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, $MgCl_2$ 2,5 mM; KCl 20 mM; PVS 10 µg/ml) et recentrifugation 5 minutes à 1 500 g.

3 . ETUDE DES NUCLEOLES ISOLES, EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

In situ :

Les cellules d'hépatome ascitique de Zajdela possèdent des noyaux arrondis d'environ 15 µm de diamètre, contenant en moyenne deux nucléoles volumineux. Une étude *in situ* en microscopie électronique avait été précédemment effectuée sur le noyau de ces cellules d'hépatome (SIMARD et al. -1969-): La chromatine, sous forme condensée, est accolée à la membrane nucléaire et à la périphérie du nucléole, délimitant ainsi un espace interchromatinien où sont reconnaissables des particules mesurant entre 200 et 300 Å, appelées grains interchromatiniens (BERNHARD et GRANBOULAN -1963-). La distribution topographique intranucléaire d'autres entités morphologiques de type RNP, comme les fibrilles et grains périchromatiniens, est analogue à celle qui avait pu être observée sur divers types de cellules de mammifères par MONNERON et BERNHARD (1969). Le nucléole contient des granules mesurant de 150 à 200 Å qui sont dispersés dans un réseau de forte densité électronique. On peut également distinguer dans cette matrice protéique diffuse des fibrilles de 50 Å de diamètre. Ces deux types de constituants

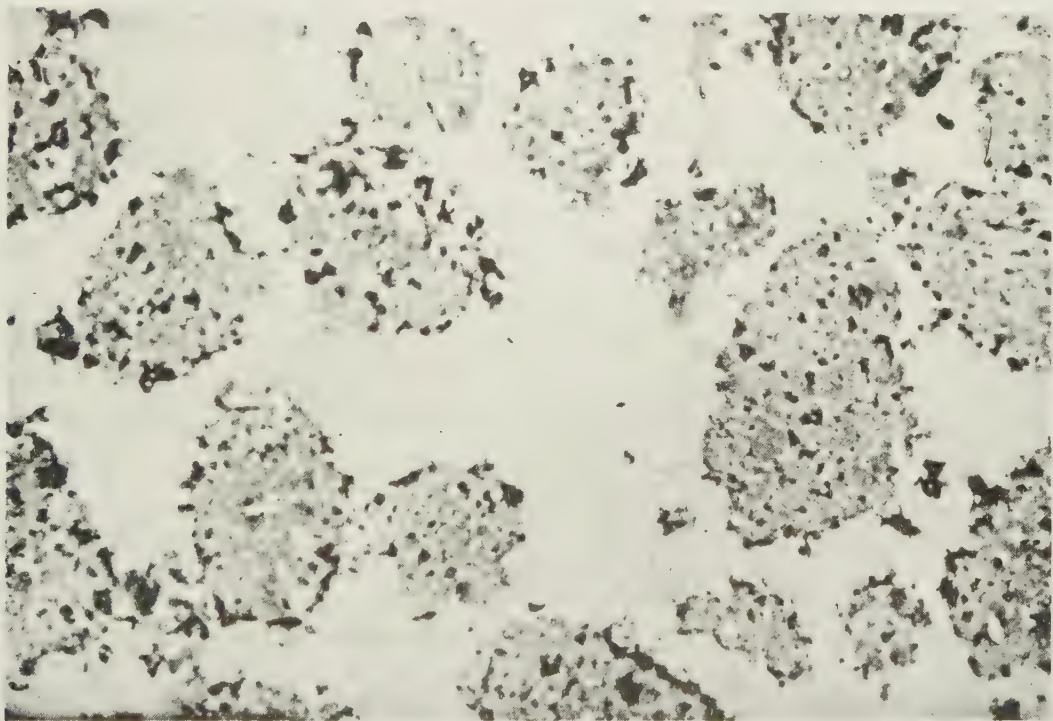
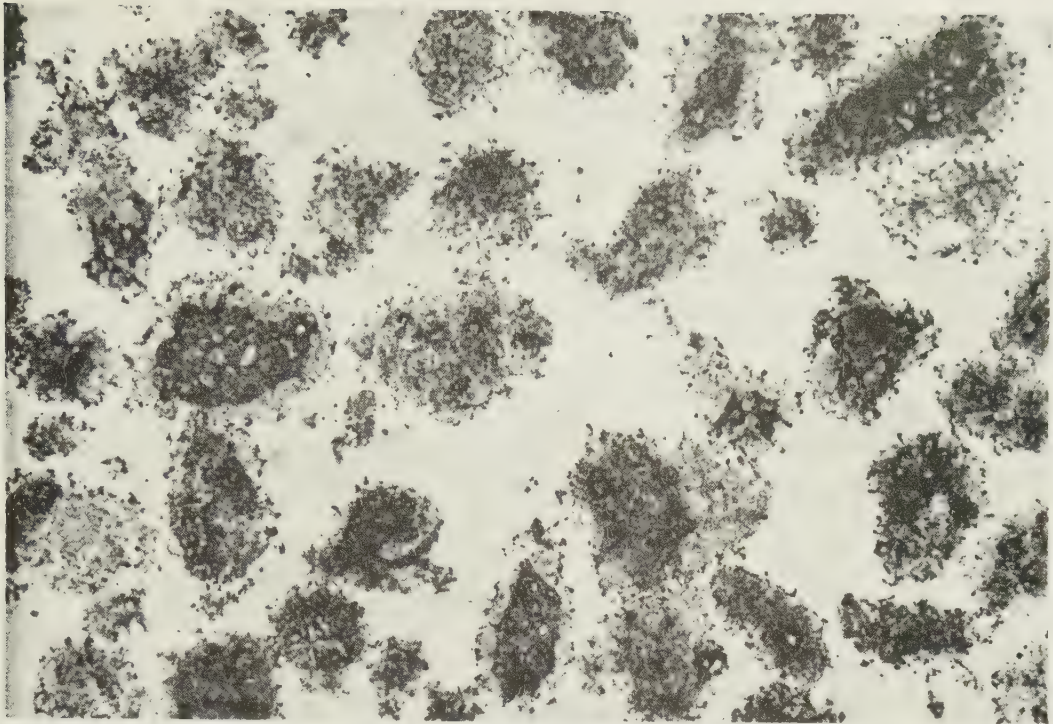
nucléolaires caractéristiques, de nature RNP, avaient été observés et identifiés initialement par MARINOZZI et BERNHARD (1963). GRANBOULAN et GRANBOULAN (1965) avaient montré, par autoradiographie à haute résolution, la localisation préférentielle de l'ARN nouvellement synthétisé au niveau des RNPs de type fibrillaire avant qu'il n'apparaisse dans les RNP granulaires, dans le nucléole de cellules de rein de singe. Une évolution analogue, marquage de ces deux classes de RNP, a pu être observée, dans notre laboratoire, sur les cellules d'hépatome ascitique (SIMARD et al.-1969-). Il est également possible de reconnaître, au niveau du nucléole in situ, la chromatine périnucléolaire, très dense et très contrastée. Après digestion des coupes par la pepsine et la RNAase, il devient possible de distinguer un réseau de chromatine intranucléolaire prolongeant la chromatine périnucléolaire. Cette fraction de chromatine intranucléolaire est relativement abondante dans les cellules d'hépatome ascitique (SIMARD et al.-1969-). Elle paraît être préférentiellement impliquée dans la synthèse d'ARN nucléolaire.

Nucléoles isolés :

La pureté des préparations apparaît très élevée : la contamination par les noyaux non rompus est exceptionnelle et la présence de mottes de chromatine non nucléolaire est rare. L'intégrité ultrastructurale de l'appareil nucléolaire se révèle bien préservée. Les constituants nucléolaires caractéristiques, fibrilles et granules, chromatine périnucléolaire et ses ramifications intranucléolaires, conservent une organisation topographique très proche de celle qui est observée in situ (Planche 1).

Techniques ultrastructurales :

Cette étude a été réalisée en étroite collaboration avec le Professeur SIMARD qui a largement contribué à l'interprétation des résultats. Les cellules ou fractions subcellulaires isolées sont d'abord "fixées" soit à l'acide osmique (1 % dans tampon acétate de véronal pendant 1 heure), soit au glutaraldéhyde (2,5 % dans tampon Sorensen à pH 7 pendant 30 minutes).



Nucléoles de cellules d'hépatome ascitique de Zajdela préparés à basse force ionique

- Analyse directe (x 6.500)
- Coupes traitées à la pepsine et à la Rnase (x 10.000)

Cette dernière technique permet le traitement ultérieur des coupes par les enzymes, notamment RNA ase et pepsine. Les échantillons fixés sont ensuite déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentration croissante, puis inclus dans l'Epon, ou bien dans du glycol méthacrylate (GMA) si un traitement est prévu ultérieurement. Après polymérisation, les blocs dans lesquels ont été inclus les échantillons sont découpés à l'Ultramicrotome et recueillis sur des treillis préalablement recouverts de formvar et de carbone. Pour l'observation directe, le contraste est obtenu par traitement des coupes ultra-fines à l'acétate d'uranyle (0,5 % pendant 10 minutes) puis au citrate de plomb (5 minutes). Les digestions enzymatiques sont effectuées sur les coupes fixées à la glutaraldéhyde et incluses dans le GMA dans l'ordre suivant :

- 0,5 % pepsine dans 0,1 N HCl (pH 1,5) pendant 1 heure à 37°C.
- 0,1 % RNAase dans l'eau (pH 6,8) pendant 1 heure à 37°C.
- 0,5 % pepsine dans 0,1 N HCl (pH 1,5) pendant 5 minutes à 37°C.
- 0,1 % RNAase dans l'eau (pH 6,8) pendant 1 heure à 37°C.

Ces traitements permettent une bonne extraction des RNP_s et un contraste amélioré des DNP_s. Ils sont indispensables pour pouvoir mettre en évidence la chromatine intranucléolaire, qui n'apparaît pas à l'observation directe. La digestion par "flottation" des coupes ultrafines sur les diverses solutions enzymatiques, est réalisée selon la technique de LEDUC (1967). Les coupes sont ensuite colorées comme précédemment, avant examen au microscope électronique SIEMENS ELMISKOP (80 kV).

4 . CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES NUCLEOLES ISOLEES .

— Rendement de la préparation :

Un rendement faible peut limiter sérieusement l'interprétation de toute étude ultérieure sur la population isolée, qui peut alors ne pas être exactement représentative de la population totale initiale. La technique d'isolement qui a été décrite permet d'obtenir un rendement élevé. Les noyaux isolés sont récupérés à plus de 95 % tandis que plus de 40 % des nucléoles initialement présents dans les cellules intactes sont isolés dans la fraction purifiée dite culot 450 g. Une part égale de nucléoles isolés peut être récupérée du surnageant 450 g correspondant par une centrifugation plus poussée (1500 g). Cependant, cette deuxième fraction nucléolaire,

TABLEAU I :

Composition Chimique des Nucléoles Isolés.

Les nucléoles sont isolés des cellules d'hépatome ascitique ou des cellules CHO par la méthode de ZALTA et al. -1971 .

Les valeurs indiquées entre parenthèse correspondent aux résultats obtenus quand les nucléoles sont isolés selon la technique décrite par NAKAMURA et al. - 1967.

Origine des Cellules	ADN	ARN	Protéines
Hépatome ascitique du rat	1,1 (1,3)	1,2 (1,2)	7,8 (8)
C.H.O.	1,2	1,3	5

(Les résultats sont exprimés en pg/nucléole)

dite culot 1 500 g, contient des contaminations chromatinienne non nucléolaires et ne sera pas utilisée pour les études décrites plus loin.

— *Dosages chimiques :*

La composition quantitative globale du nucléole isolé en ADN, ARN et protéines a été déterminée pour les cellules d'hépatome ascitique

et pour les cellules CHO. Pour ces déterminations, la concentration en nucléoles d'une suspension de nucléoles isolés est mesurée par comptage à l'hématimètre, au microscope à contraste de phase. Les divers dosages sont effectués sur des parties aliquotes de la suspension nucléolaire. L'ADN est dosée selon la technique de BURTON (1962) modifiée par GILLES et MYERS (1965), l'ARN par la méthode de MEJBAUM (1939) et les protéines selon LOWRY et al. (1962). Après dissolution complète des protéines par une solution de Sarkosyl (contenant NaOH 0,006 N). Dans le tableau 1 sont présentés les résultats obtenus pour les deux types cellulaires étudiés, ainsi que, pour les cellules d'hépatome ascitique du rat, ceux obtenus en mettant en oeuvre la technique d'isolement des nucléoles décrite par NAKAMURA et al. (1967).

Nous avons observé, selon les préparations, une certaine variabilité du taux d'ADN qui reste lié aux structures nucléolaires isolées. Cet effet n'est pas surprenant si l'on tient compte des continuités qui peuvent exister in situ entre l'ADN nucléolaire et l'ADN extra-nucléolaire. La sonication restant un mode de dissection structurale relativement imprécis, on peut prévoir que des fluctuations en puissance ou en durée peuvent entraîner des modifications plus ou moins sensibles de la quantité d'ADN liée au nucléole. Pour une étude fine de la chromatine périnucléolaire, il importe donc que l'étape de sonication soit standardisée de façon stricte et que la reproductibilité de ses effets soit contrôlée avec précision. Ce contrôle peut être obtenu par l'utilisation constante, dans une même série d'expérimentations, d'un même standard cellulaire interne (cellules marquées pendant un temps donné par un isotope particulier). L'ARN, par contre, du fait de sa distribution topographique différente dans le nucléole, est retrouvé dans les nucléoles isolés en quantités très stables.

— ADN Nucléolaire :

Par hybridation nucléolaire avec l'ARN ribosomique de 28 et 18S, nous avons pu établir que l'ADN lié au nucléole (isolé par la méthode qui vient d'être décrite) contient les cistrons ribosomiques: les séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique représentent 0,37 % de l'ADN nucléolaire de type 45S. Nous avons vérifié que l'ARN nucléolaire contient les séquences des ARNs ribosomiques de 28 et 18S en mettant en oeuvre les mêmes techniques d'hybridation nucléolaire. Les hybridations ont été effectuées entre l'ADN extrait des nucléoles isolés, et l'ARN marqué extrait de ces mêmes nucléoles, en présence ou en l'absence d'ARN ribosomique cytoplasmique froid, utilisé comme compétiteur. L'ADN est fixé sur membrane et l'incubation est effectuée en présence d'ARN pendant 5 jours à 40°C, en présence d'urée 8 M (KOURILSKY et al.-1970-). D'après les taux d'hybridation mesurés, et connaissant les quantités d'ADN dans un nucléole isolé, il est possible de déterminer le nombre de cistrons ribosomiques par nucléole. Pour les cellules d'hépatome ascitique, le taux de redondance qui peut être calculé d'après nos résultats expérimentaux, est de l'ordre de 700. C'est une valeur proche de celles qui ont pu être déterminées jusqu'à présent sur d'autres types de cellules eucaryotes.

Les résultats qui viennent d'être mentionnés ont été obtenus en collaboration avec F. AMALRIC qui, dans le laboratoire, s'est particulièrement consacré à l'étude de l'ADN nucléolaire. (voir AMALRIC -1973-).

— ARN-polymérase.

Les cellules eucaryotes renferment plusieurs types d'ARN-polymérase (voir revue CHAMBON et al.-1974-). Trois grandes classes ont pu

être définies d'après leur mode de réponse à l'action d'un inhibiteur spécifique, l' α -amanitine. Les enzymes de type A sont résistantes à toute concentration d' α -amanitine. Celles de type B sont inhibées par de faibles concentrations, tandis que les enzymes de type C ne sont inhibées qu'à de fortes concentrations d' α -amanitine. Des localisations intracellulaires définies ont pu être attribuées à certaines de ces enzymes ainsi qu'une spécialisation dans la synthèse de classes particulières d'ARNs.

L'ARN-polymérase responsable de la transcription des cistrons ribosomiques est préférentiellement localisée dans le nucléole (ROEDER et RUTTER -1970-), elle est de type A. Dans les cellules d'hépatome ascitique, les trois types d'activité ARN-polymérasique, ont été mis en évidence. Dans le nucléole isolé, l'activité ARN-polymérasique est principalement de type A; de l'activité de type B peut être décelée mais en proportion beaucoup plus faible que dans la cellule entière (AMALRIC -1973-)

Nous avons donc pu retrouver, au niveau de l'appareil nucléolaire isolé, d'une part les cistrons ribosomiques répétés et, d'autre part, l'enzyme spécifique responsable de leur transcription, l'ARN-polymérase de type A.

Nous avons ultérieurement entrepris d'identifier et de caractériser, dans ces nucléoles isolés, les produits des gènes nucléolaires, qui peuvent être détectés sous forme de complexes RNPs.

En préalable à l'étude des éléments RNPs nucléolaires, nous avons caractérisé les divers types d'ARN présents dans le nucléole isolé et étudié les relations fonctionnelles entre ces molécules.

5 . ETUDE DE L'ARN NUCLEOLAIRE .

Les divers types de molécules d'ARN présentes dans le nucléole isolé ont été identifiées après extraction chimique de l'ARN nucléolaire total puis fractionnement (soit par ultracentrifugation en gradient de densité de saccharose, soit par électrophorèse sur gel de polyacrylamide).

La séquence de maturation de ces produits de transcription a été étudiée par des cinétiques de marquage des différentes espèces moléculaires d'ARN après incorporation d'Uridine (^3H) par les cellules entières.

d) Techniques :

Extraction de l'ARN nucléolaire total :

Le culot de nucléoles (environ 10^8 nucléoles) est repris par 2 ml de milieu d'extraction (CH_3COOK 0,05 M, pH 5,1, NaCl 0,14 M, SDS 1 %; PVS 20 $\mu\text{g/ml}$) et la suspension est homogénéisée à l'Ultra-turrax pendant 30 secondes à basse vitesse. Un volume égal (2 ml) de phénol (saturé par le tampon CH_3COOK 0,05 M et contenant 1 mg/ml de 8-hydroxy-quinoléine)^{est} ajouté. Après 30 secondes d'homogénéisation à l'Ultra-turrax, le mélange est agité vigoureusement pendant 10 minutes à 65°C puis 15 minutes à température ambiante. Après 5 minutes de centrifugation à 5 000 g, dans des tubes coniques en verre, la phase aqueuse est récupérée puis réextraite 10 minutes à température ambiante par un volume égal de phénol (saturé en tampon acétate). L'ARN dans la phase aqueuse, rendue 0,2 M en CH_3COOK (pH 5,1), est précipité par addition de 2,5 volumes d'éthanol glacé. La suspension alcoolique est placée à - 15°C pendant plusieurs heures pour permettre une précipitation plus complète. Le précipité d'ARN est ensuite recueilli par centrifugation (10 minutes à 5 000 g) dans des tubes coniques en verre. Après décantation de l'éthanol, les parois du tube sont séchées et l'ARN est redissous dans le tampon voulu en fonction des analyses prévues.

Analyse de l'ARN :

Initialement, ces analyses ont été effectuées par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose. Cette technique peut être mise en oeuvre rapidement. De plus, les diverses espèces moléculaires séparées peut être aisément récupérées des diverses fractions du gradient. Cependant, l'ARN nucléolaire se compose de nombreuses espèces à masses molaires relativement proches : des études quantitatives fines exigent une résolution élevée qui ne peut être atteinte dans ces conditions. Nous avons donc été amenés à utiliser la technique de séparation par électrophorèse sur gel mixte de polyacrylamide-agarose. Plus longue et délicate que la précédente, elle permet une résolution bien supérieure.

Gradient de densité de saccharose :

L'ARN nucléolaire (jusqu'à 400 µg) est dissous dans 0,2 ml d'une solution de saccharose à 5 % dans un tampon acétate (CH_3COOK 0,01 M pH 5,1; NaCl 0,1 M ; EDTA 1 mM; PVS 20 µg/ml) et déposé sur 5 ml d'un gradient linéaire 10-40 % de saccharose dans le même tampon acétate formé dans un tube de nitrate de cellulose. La séparation est réalisée par une centrifugation de 2 heures à 48 000 t/mn dans le rotor Spinco SW 50. Des fractions de 3 gouttes sont ensuite recueillies par percement du fond du tube. La densité optique de chaque fraction, après dilution convenable, est lue à 260 nm et 280 nm. La radioactivité est déterminée par comptage direct des fractions (ou des parties aliquotes), dans 10 ml de liquide scintillateur (5 g/l de Butyl PBD dans un mélange contenant 70 % de toluène et 30 % de OP 1062 (v/v). L'OP 1062 fourni par UGINE-KUHLMAN, est un octyl-phénol à 10 molécules d'oxy-éthylène, qui permet au mélange scintillateur d'absorber, en une seule phase liquide, une proportion d'eau importante (jusqu'à 10 %). Les mesures de radioactivité sont faites au spectromètre à scintillation Tricarb (PACKARD) avec un rendement de 20 % environ pour le tritium.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :

Elle est effectuée selon la technique décrite par TIOLLAIS et al. (1972) qui a bien voulu en montrer, dans son laboratoire, la mise en oeuvre détaillée. L'ARN est redissous dans le tampon d'électrophorèse (Tris 10,8 g/l ; di-Na EDTA 0,93 g/l ; acide borique 5,5 g/l ; 0,2 % SDS ; pH final 8,3) contenant 20 % saccharose et des traces de bleu de bromophénol (marqueur de migration). Des échantillons de 100 µl, pouvant contenir jusqu'à 100 µg d'ARN, sont déposés, à l'aide d'une micro-seringue et à travers le tampon, au sommet des gels préalablement mis en place dans la cuve d'électrophorèse. Les gels cylindriques de 6 mm de diamètre sur 21 cm de long sont préparés, 24 heures avant l'électrophorèse, dans des tubes en altuglass. Ces gels peuvent glisser facilement dans leur tube. Avant la mise en place dans la cuve, leur longueur est exactement ajustée par découpage à l'aide d'une lame de rasoir. Cette opération permet d'obtenir des extrémités de gel très planes et améliore ainsi la résolution de la technique. Durant l'électrophorèse, le gel est maintenu en place dans le tube par un fragment de sac à dialyse, préalablement percé par quelques coups d'aiguille de manière à éviter des phénomènes d'osmose gênants en cours d'électrophorèse.

Préparation des gels :

Les produits utilisés doivent être très purs. L'acrylamide (EAST-MAN-KODAK) est repurifié par dissolution à chaud dans le chloroforme et cristallisation à froid, selon la technique de LOENING (1967). Les cristaux séchés sont stockés à l'abri de la lumière. Le bisacrylamide (N,N'-méthylène bisacrylamide) est purifié selon un procédé analogue, après dissolution dans l'acétone. Le SDS est purifié de même après dissolution dans l'éthanol bouillant.

- Solutions stocks :
- 1) A (19 % (p/v) d'acrylamide, 1 % bisacrylamide); conservée à -20°C à l'abri de la lumière.
 - 2) B, solution à 6,4 % dans l'eau de DMAPN (diméthylamino-propio-nitrile).
 - 3) C, solution de tampon concentré dix fois, conservée à -20°C .

Une concentration finale en acrylamide de 1,7 % permet d'obtenir une résolution optimale pour séparer des ARNs de haute masse molaire, comme les ARNs nucléolaires (TIOLLAIS et al.-1971-). L'introduction dans le gel de 0,5 % d'agarose (BEHRINGWERKE, Allemagne) permet d'améliorer très nettement ses qualités mécaniques (à cette concentration relativement basse en acrylamide, le gel manque de consistance, se tasse plus ou moins durant l'électrophorèse et se manipule difficilement).

La polymérisation, de type vinyle, est obtenue en utilisant comme catalyseur le système réd-ox.persulfate d'ammonium + DMAPN.

Pour préparer 40 ml de gel composé (1,7 % acrylamide ,0,5 % agarose) une solution n° 1 est d'abord préparée avec : 3,4 ml de solution-stock A , 2,5 ml de solution-stock B (DMAPN), 4 ml de solution-stock C (tampon cx10) et 14,7 ml H₂O, puis placée dans un bain-marie à 42°C.

Une solution n° 2 est obtenue par dissolution de 200 mg d'agarose dans 14,1 ml d'eau dans un erlen à col rodé muni d'une colonne à reflux, le mélange, agité continuellement, étant porté à ébullition pendant 15 minutes avant d'être placé dans le bain-marie à 42°C.

Une troisième solution contenant 16 mg/ml de persulfate d'ammonium est également préparée. Après mélange des solutions 1 et 2 équilibrées à 42°C, 1,25 ml de la solution 3 est ajouté et le mélange est alors versé dans les tubes d'électrophorèse dont l'extrémité inférieure est bouchée par du parafilm. La gélification de l'agarose puis la polymérisation de l'acrylamide s'effectuent à température ambiante.

Migration :

La séparation des ARNs est réalisée après 4 heures 50 minutes de migration, quand le bleu de bromophénol a atteint le compartiment anodique, la tension appliquée étant de 210 volts (soit un champ de 10 V/cm). Le profil en radioactivité en fonction de la distance de migration est déterminé après découpage de tranches de gel de 2 mm , soit en utilisant l'appareil manuel mis au point par TIOLLAIS (1972) soit avec le découpeur automatique GILSON. L'émission radioactive du tritium étant absorbée complètement par de faibles épaisseurs de gel, les tranches de gel sont traitées pendant une nuit par 1 ml de NH₄OH à 10 % pour hydrolyser l'ARN et solubiliser ainsi le tritium incorporé. Le comptage de radioactivité est ensuite effectué comme décrit plus haut.

Dans le cas où l'obtention des profils en densité optique est nécessaire, le gel est polymérisé dans un tube de quartz. Après électrophorèse, sa densité optique à 260 nm et 280 nm est lue sur un spectromètre SEIVE spécialement adapté à cet effet.

Etalonnage :

Il a été observé expérimentalement que la mobilité des ARNs est inversement proportionnelle au logarithme de la masse molaire (PEACOCK et al.-1968-). Cette propriété a été utilisée pour attribuer des masses molaires, ou des valeurs de S, aux diverses espèces ainsi séparées, en utilisant comme référence les ARNs ribosomiques cytoplasmiques de 18 et 28S, marqués au ¹⁴C, après incorporation d'uridine (¹⁴C) par les cellules entières, et analysés dans les mêmes conditions.

Préparation du rARN étalon :

Les cellules CHO sont marquées pendant 24 heures par addition

de 0,1 μ Ci/ml d'uridine (14 C). Après le marquage, les cellules sont reprises dans 10 volumes de tampon R (Tris-HCl 40 mM pH 7,7, KCl 25 mM ; $MgCl_2$ 4 mM) en présence de 0,5 mg/ml de collagénase et de 0,5 % (v/v) de Cémulsol NPT 6 (même série que le Cémulsol NPT 10 mais ne possédant que 6 molécules d'oxyde d'éthylène). La suspension est homogénéisée à l'Ultra-turrax à basse vitesse jusqu'à ouverture de l'ensemble des cellules sans que les noyaux n'apparaissent lysés. L'emploi de NPT 6 permet d'éviter la lyse des mitochondries et lysosomes. La suspension est ensuite centrifugée 5 minutes à 160 g pour éliminer les noyaux et le surnageant est recentrifugé 15 minutes à 15 000 g pour éliminer les mitochondries (SORVALL ROTOR SS 34). Le surnageant 15 000 g est ensuite additionné d'1/10 de volume d'une solution aqueuse à 10 % de déoxycholate de sodium, ce qui permet de détacher des ribosomes des fragments de membranes auxquels ils sont associés. Les ribosomes peuvent être récupérés sous forme de culot, par une centrifugation d'une heure à 50 000 t/m (rotor SPINCO 50).

L'ARN ribosomique est extrait du culot de ribosomes après reprise par 2 ml de tampon (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 1 % SDS, PVS 50 μ g/ml) par agitation au POTTER addition d'un volume égal de phénol (saturé de tampon) et agitation vigoureuse pendant 30 minutes à 4°C. La phase aqueuse résultante peut être réextraite dans les mêmes conditions. L'ARN qu'elle contient est finalement précipité par addition d'éthanol comme dans le cas de l'ARN nucléolaire.

Résultats de l'analyse d'ARN nucléolaire.

- Distribution quantitative des différentes espèces.

La figure 1 montre le fractionnement des ARNs nucléolaires (représ par mesure de la densité optique à 260 nm) obtenu après, respectivement, une analyse en gradient de densité de saccharose (a) et une électrophorèse en gel mixte d'acrylamide-agarose (b).

Dans le premier cas, 2 populations majeures sont séparées : la plus importante sédimente autour de 30S, l'autre à 45S environ. Par électrophorèse, la résolution est nettement améliorée : l'espèce 45S de plus haute masse molaire, est nettement séparée des molécules plus courtes. Les types 32 et 28S sont alors bien distincts. Un pic correspondant à 18S, avec un épaulement à 20S, est également bien visible. D'autres épaulements à 41S et 24S sont apparents.

Des ARNs de faible masse molaire n'apparaissent pas en quantités significatives.

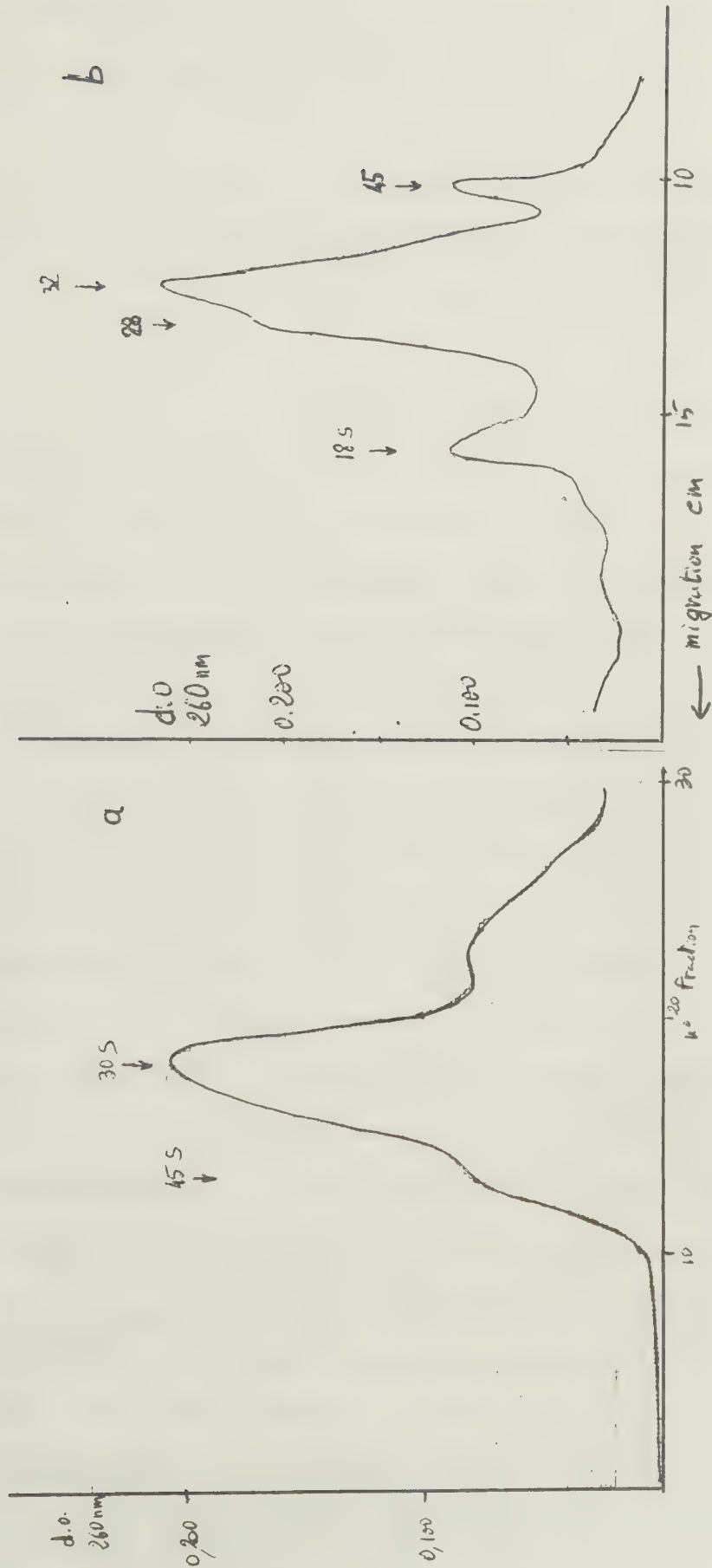


Figure I : Analyse comparée de l'ARN nucléolaire total séparé par :

a) Ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose (IO-40%)

2 heures à 42 000 t/mn (rotor SW 50).

b) Electrophorèse sur gel d'acrylamide-agarose .

Les résultats obtenus pour les deux espèces cellulaires étudiées, l'hépatome ascitique et les cellules de hamster (CHO) apparaissent tout à fait identiques.

Les valeurs de S ont été attribuées par référence à de l'ARN ribosomique cytoplasmique marqué soumis à l'électrophorèse ou à l'analyse par gradient de densité dans les mêmes conditions.

b) Cinétique de marquage de l'ARN nucléolaire.

Les résultats en sont décrits Figure 2. Après addition d'uridine (^3H) à une suspension de cellules d'hépatome ascitique incubés in vitro, des parties aliquotes de la suspension sont prélevées à des intervalles donnés. Les nucléoles correspondants sont isolés, l'ARN nucléolaire est extrait puis analysé par électrophorèse sur gel d'acrylamide-agarose.

Pour un temps court de marquage, c'est-à-dire 3 minutes, l'ARN 45S est déjà marqué mais on observe aussi une relative dispersion du marquage dans des molécules plus courtes (fig. 2a). Connaissant la vitesse moyenne de transcription de l'ADN -environ 5000 à 7000 nucléotides/minute (BUSCH et SMETANA -1970-) et la taille de la molécule de 45S (environ 12 000 nucléotides, d'après sa mobilité relative avec les ARNs ribosomiques cytoplasmiques), on peut attribuer une valeur voisine de 2 minutes au temps de transcription d'une chaîne de 45S (GREENBERG et PENMAN -1966-). Pour un marquage de 3 minutes, une partie non négligeable de la radioactivité incorporée doit donc être retrouvée dans des molécules, en cours de synthèse et non terminées, de longueurs différentes (voir Ch. 3, p).

Après 10 minutes de marquage, le pic d'ARN de 45S se détache plus nettement (fig. 2b). Au bout de 30 minutes (fig. 2c) cette espèce reste très abondamment marquée, mais une part notable de radioactivité apparaît au niveau des types 41 et 32S. Après 4 heures d'incorporation (fig. 2d),

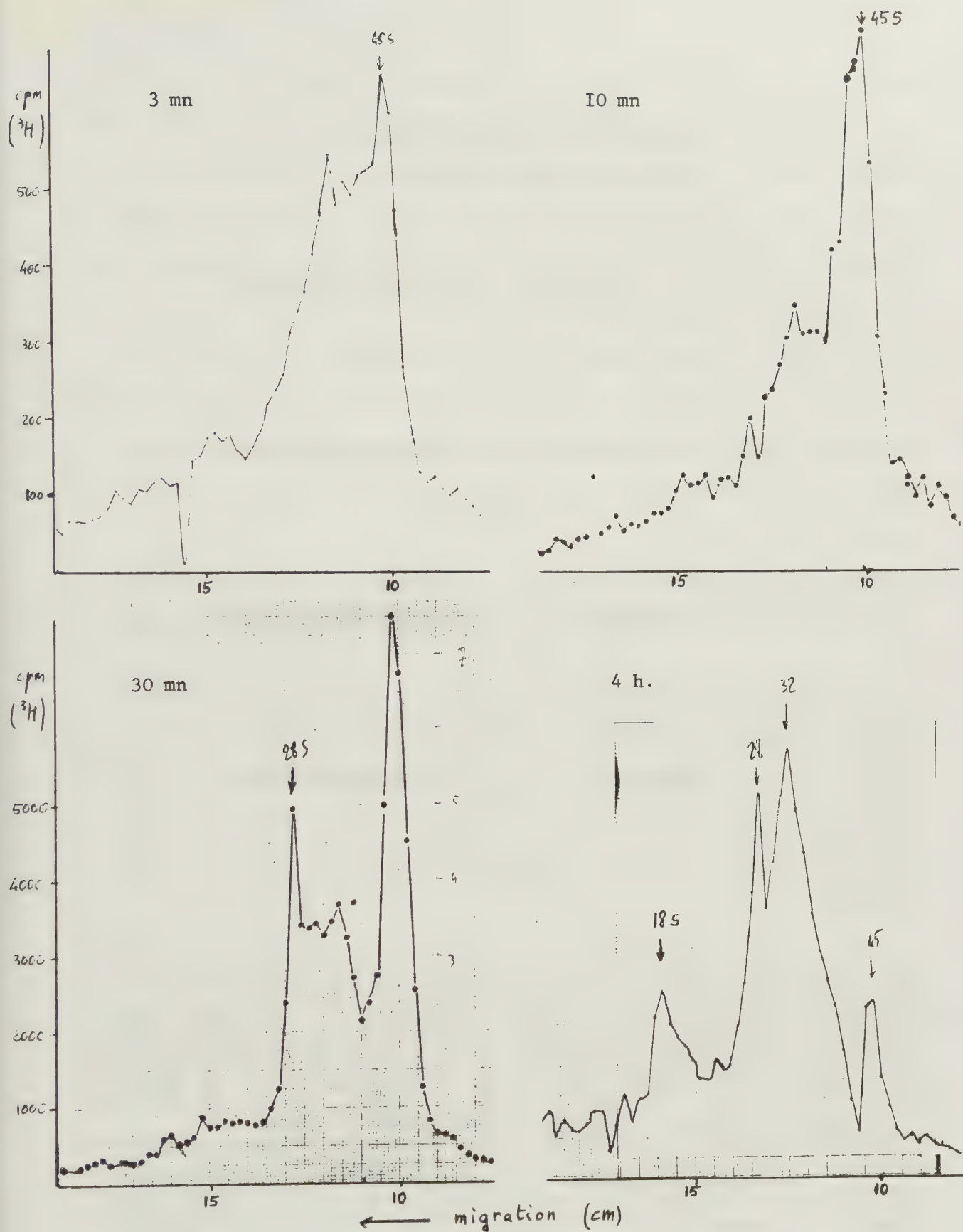


Figure 2 : Cinétique de marquage des ARNs nucléolaires .

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées in vitro par incorporation d'uridine (^3H) pendant des temps croissants. L'ARN est extrait des nucléoles isolés puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose.

c'est le pic 32S qui est devenu le plus marqué. La part de radioactivité totale retrouvée au niveau du 45S a nettement décru. Le marquage de l'ARN 28S est alors relativement important. Les espèces plus courtes 24, 20 et 18S sont alors bien décelables. Quand la durée d'incorporation atteint ou dépasse 4 heures, le profil en radioactivité devient exactement superposable à celui de densité optique.

Une évolution analogue, bien que légèrement plus rapide, a pu être observée pour les cellules CHO. Les résultats de cette étude cinétique sont tout à fait compatibles avec l'existence de relations "précurseur à produits" entre l'ARN 45S et les espèces moléculaires plus courtes présentes dans le nucléole.

c) Discussion: Comme nous l'avons signalé en introduction, la caractérisation rigoureuse de la séquence d'évènements impliqués dans la maturation de l'ARN ribosomique a été obtenue par la convergence d'études très diverses.

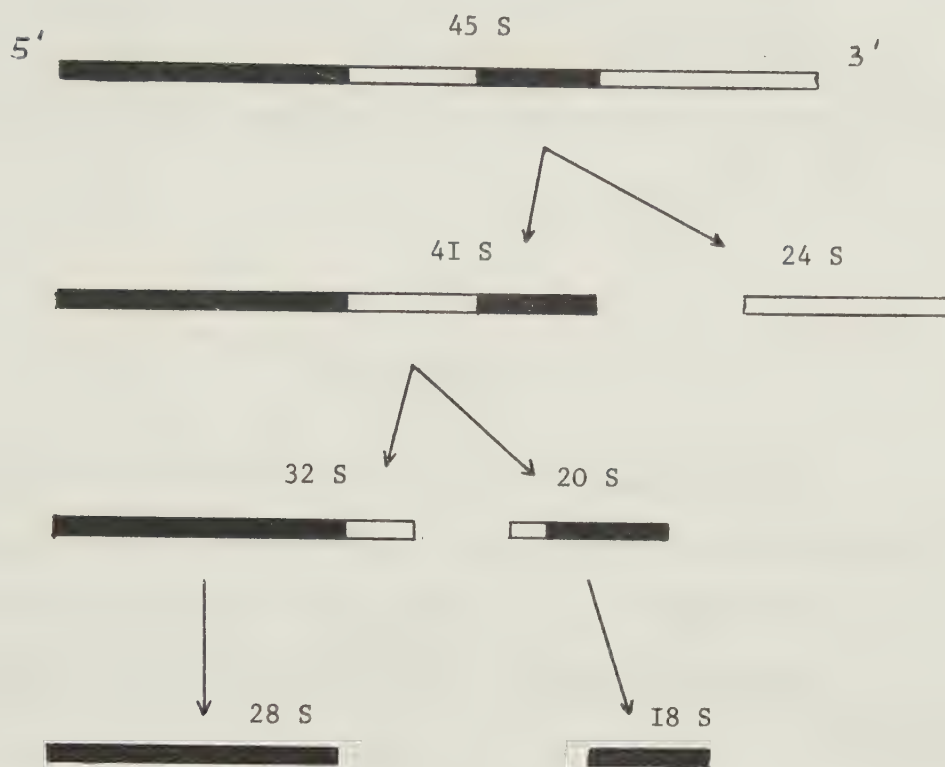
Outre les cinétiques de marquage continu des ARNs nucléolaires, des expériences de "chasse" ont été réalisées et ont permis de montrer le passage de la radioactivité incorporée pendant un temps court dans l'ARN 45S dans des ARNs à chaînes plus courtes (SCHERRER -1963-). Cependant une "chasse" effective ne peut être obtenue par simple dilution isotopique, du précurseur marqué dans le milieu extra-cellulaire : il est nécessaire de bloquer également toute nouvelle biosynthèse d'ARN préribosomique, en faisant appel à un antibiotique. Les perturbations du métabolisme cellulaire qui en résultent et l'intervention éventuelle de mécanismes intracellulaires de régulation peuvent rendre difficile l'interprétation de ces résultats.

De nombreux antibiotiques agissent sur la maturation ribosomique en bloquant sélectivement la réalisation de certaines étapes fonctionnelles. Leur utilisation a permis de mieux caractériser ces processus. Cela a été le cas pour la thioacétamide (BUSCH et al. -1966-), la puromycine (PERRY -1964-), le 8-azaguanine (PERRY -1965-), la toyocamycine (TAVITIAN et al. -1969-) ou la camptothécine (KUMAR et WU -1973-). L'isolement de mutants pour lesquels la biosynthèse ribosomique est affectée a déjà été signalé (TONIOLO et al. -1973-). Il peut permettre une étude plus approfondie de la séquence des réactions de maturation.

Nous avons cité plus haut les principales méthodes d'analyse physicochimique des molécules d'ARN qui ont contribué également à l'établissement du schéma suivant où sont précisées les principales réactions de transformation de la molécule d'ARN préribosomique, chez les mammifères:

MATURATION DE L'ARN RIBOSOMIQUE

CHEZ LES MAMMIFERES .



Ce schéma ne peut rendre compte de l'ensemble des réactions qui entrent en jeu dans le processus de maturation. Seules celles qui correspondent à la formation de molécules à durée de vie suffisamment longue pour permettre la détection d'espèces discrètes, ont pu être identifiées sans que les mécanismes réactionnels aient été jusqu'ici définis avec précision.

La molécule d'ARN précurseur dit "45S" contient les séquences de chacune des deux molécules d'ARN ribosomique de 18 et 28S. La séquence du 28S est située à l'extrémité 5'-OH du précurseur 45S. Des séquences non conservées la séparent de la région 18S, elle-même séparée de l'extrémité 3'-OH du précurseur par une autre région non-conservée.

En fait, la fraction dite "45S" ne semble pas homogène du point de vue moléculaire et 3 espèces de tailles très variées (47, 46, 45S) ont pu y être détectées; la molécule la plus longue, dont la durée de vie est faible, semble correspondre à un précurseur des 2 autres espèces, la forme 45S apparaissant la plus stable des 3 (TIOLLAIS -1971-). Les clivages

spécifiques qui interviennent à divers stades semblent résulter de l'action combinée d'endo- et d'exo-nucléases (LIAU et al.-1968- KELLEY & PERRY -1971- MIRAULT et SCHERRER -1972a-). Certaines de ces nucléases nucléolaires ont pu être isolées (MIRAULT et SCHERRER -1972b- WINICOV et PERRY -1974-). La caractérisation précise et leur éventuelle spécificité restent cependant à établir. Les diverses formes nucléolaires d'ARN prérribosomiques diffèrent par leur stabilité et, par suite, par leur abondance relative dans les nucléoles. Ces différences se traduisent notamment par des temps différents d'élabo-ration pour l'ARN 28S et pour l'ARN 18S, comme cela a été observé en étu- diant la cinétique d'apparition de ces ARNs dans les ribosomes cytoplasmiques (PERRY -1967-).

CONCLUSION

Les techniques de fractionnement mises en oeuvre ont permis d'isoler un système chromatinien hautement organisé dont les caractéris- tiques ultrastructurales et biochimiques apparaissent bien préservées.

Les nucléoles purifiés ont pu être isolés de différentes souches cellulaires avec un rendement élevé, leur aspect ultrastructural reste très proche de celui observé in situ et les constituants morphologiques caractéristiques conservent leur organisation topographique native. Les cistrons ribosomiques et le produit initial de leur transcription, l'ARN précurseur ribosomique de 45S, sont présents dans le système isolé et en proportions telles que des fuites éventuelles en cours de fractionnement ne peuvent être que négligeables. Les autres ARNs intermédiaires de la ma- turation ribosomique sont également retrouvés.

L'obtention de ces résultats constituait un préalable essentiel à une étude plus approfondie de l'organisation du système chromatinien nucléolaire, au niveau moléculaire. Nous avons alors entrepris d'isoler du nucléole, puis de caractériser les entités RNPs dans lesquelles sont inté- grés les ARNs prérribosomiques et qui représentent un premier niveau d'orga- nisation supramoléculaire détectable in situ dans le nucléole.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE 2

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PRERIBOSOMES NUCLEOLAIRES

INTRODUCTION

L'étude de l'organisation du système chromatinien nucléolaire implique la caractérisation de divers types de complexes supramoléculaires à l'intérieur du nucléole. en particulier celle des RNPs préribosomiques.

Nous avons défini une méthode de dissociation partielle des structures nucléolaires qui nous a permis d'isoler, sous forme de complexes RNPs, l'ensemble des produits de la transcription des gènes nucléolaires.

L'étude corrélative biochimique et ultrastructurale de ces éléments RNPs isolés a confirmé leur nature préribosomique.

Dans les cellules de mammifères, le produit de la transcription des gènes ribosomiques est un ARN de type 45S (PERRY -1962- SCHERRER et al. -1962-). Cet ARN et les produits de sa maturation peuvent être isolés du nucléole sous forme de complexes RNPs. Les caractéristiques de ces RNPs isolées (et notamment la longueur de la molécule d'ARN, le contenu en protéines, leur conformation et, en conséquence, leur vitesse de sédimentation) peuvent être notablement affectées par les conditions physicochimiques d'extraction, qui peuvent, par ailleurs, favoriser la formation de complexes artificiels. Par des techniques d'extraction différentes, dans des conditions où l'intégrité de ribosomes cytoplasmiques est préservée, deux grands types de RNP nucléolaires ont pu être mis en évidence, sédimentant à environ 80 et 55S en l'absence d'ion Mg^{++} (WARNER et al. -1967- LIAU et al. -1969- MIRAULT et al. -1971- BACHELLERIE et al. -1971-). Ces deux formes majeures de RNPs nucléolaires, de 80S et de 55S, contiennent respectivement des ARNs de 45 et 32S, associés à un nombre élevé de protéines qui représentent environ la moitié de la masse de la particule RNP (LIAU et al. -1969-).

Du point de vue de l'organisation ultrastructurale in situ, les études en microscopie électronique ont montré que l'ARN nucléolaire se trouve intégré dans deux classes morphologiques de RNPs, l'une de type granulaire, l'autre de type fibrillaire. Ces deux types de RNPs peuvent être regroupés dans des zones relativement homogènes, ou bien dispersés à peu près régulièrement dans le nucléole sans localisation préférentielle (MARINOZZI et BERNHARD -1963- pour revue voir BERNHARD -1966-). Par autoradiographie à haute résolution, après des "pulses" courts à l'uridine tritiée, GRANBOULAN et GRANBOULAN (1965) ont observé que l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé se trouvait d'abord essentiellement au niveau des RNPs fibrillaires avant d'apparaître dans les RNPs granulaires. Cette tran-

sition est détectable après un temps de marquage de l'ordre de 10 minutes, temps assez proche de celui au bout duquel apparaissent dans le nucléole des molécules d'ARN de 32S, produites durant la maturation de l'ARN précurseur ribosomique de 45S.

Du fait de cette coïncidence, du point de vue chronologique, entre une transition morphologique (fibrille $\longrightarrow$ granule) et une transition moléculaire de l'ARN préribosomique (45S $\longrightarrow$ 32S), et en tenant compte du contenu spécifique en ARN des RNPs nucléolaires isolés, on a pu envisager que les RNPs isolées de 80 et 55S correspondent respectivement aux formes natives fibrillaires et granulaires.

Diverses études, publiées avant ou pendant le développement de notre travail en ce domaine, ont établi que les ARNs nucléolaires pouvaient être isolés sous forme de complexes RNPs. Nous avons nous-mêmes entrepris de mettre au point une technique d'isolement des éléments préribosomiques nucléolaires qui soit adaptée aux caractéristiques des nucléoles tels que nous pouvons les isoler.

I. GENERALITES :

Définition d'un système d'isolement des préribosomes nucléolaires.

Pour une étude approfondie des processus de la maturation ribosomique, il importe de déterminer les correspondances entre ces RNPs isolées et les RNPs nucléolaires in situ. De ce point de vue, pour une comparaison valable des résultats obtenus par divers auteurs, il est nécessaire de tenir compte :

- des caractéristiques des nucléoles isolés à partir desquels sont extraits les préribosomes;
- des conditions physicochimiques utilisées pour extraire et analyser les éléments préribosomiques;
- des taux d'extraction obtenus.

La structure et le contenu des nucléoles isolés peuvent varier sensiblement en fonction des conditions d'isolement : la structure native

peut être plus ou moins bien préservée, certains constituants macromoléculaires caractéristiques pouvant être modifiés ou même perdus. En conséquence, quand on applique à des nucléoles isolés différemment une technique définie d'extraction de préribosomes, les résultats obtenus peuvent être variables, soit que divers types de préribosomes ne soient plus présents dans les mêmes proportions dans les nucléoles isolés (possibilités de fuite durant le fractionnement cellulaire, ou d'hydrolyse in vitro de leur ARN) soit qu'ils ne puissent être libérés dans les mêmes conditions, la structure nucléolaire qui les contient étant dans un état différent.

A ce propos, il convient de noter que la plupart des méthodes d'extraction décrites par d'autres auteurs (WARNER -1967 ; MIRAULT 1971) ont été appliquées à des nucléoles isolés dont les caractéristiques diffèrent notablement de ceux que nous pouvons obtenir par la méthode exposée dans le chapitre précédent. En particulier, la rupture des noyaux est

souvent obtenue par une destruction extensive de la chromatine nucléaire; c'est le cas dans le procédé de PENMAN et al (1966) qui associe l'emploi d'un milieu à force ionique élevée (0,5 M NaCl) et l'utilisation de DNAase. Les nucléoles qui peuvent ainsi être isolés sont dépourvus de la "coque" de chromatine nucléolaire qui est préservée dans nos conditions de préparation. Cette importante différence structurale peut se traduire par des différences de comportement lors de l'extraction des préribosomes. De plus, il a pu être établi ultérieurement (VESCO et PENMAN -1968-) que l'utilisation de milieu à force ionique élevée (0,5 M en NaCl) entraînait des fuites importantes de certains types d'ARNs nucléolaires, comme le 32S. Ces formes d'ARNs nucléolaires sont conservées dans les nucléoles isolés par notre méthode dans des conditions où les contaminations extranucléolaires apparaissent tout à fait négligeables.

Les complexes RNPs nucléolaires se sont avérés relativement instables (LIAU et al.-1969-) dans diverses conditions d'isolement. Les conditions physicochimiques employées peuvent affecter leurs caractéristiques biochimiques et ultrastructurales. Ainsi, selon la force ionique utilisée, on peut envisager soit la perte de protéines spécifiques, soit l'adsorption de protéines non spécifiques, soit encore la formation d'agrégats interparticulaires. En particulier, tout comme pour les ribosomes cytoplasmiques (SPIRIN -1974-), l'utilisation de concentrations bien définies en ion Mg^{++} joue un rôle essentiel dans le maintien de la structure du complexe RNP.

D'autre part, l'ARN intégré dans les RNPs est extrêmement sensible à l'action de nucléases qui sont normalement présentes in situ au niveau des RNPs nucléolaires pour participer à leur maturation. Ces nucléases peuvent agir in vitro au cours de l'isolement des particules, et provoquer ainsi l'apparition de produits artificiels dont les caractéristiques peuvent être proches de celles d'intermédiaires naturels de la maturation. Cette action enzymatique prenant place in vitro peut être plus ou moins marquée selon les conditions physicochimiques utilisées; dans tous les cas, son étendue doit être déterminée autant que possible, pour une interprétation valable des résultats. Il faut noter à ce propos que par certaines techniques d'extraction (WARNER et al.-1967), la libération des préribosomes n'est possible qu'après incubation à des températures relativement élevées (20-25°C); appliquées à notre matériel nucléolaire, ces conditions ont conduit à une dégradation relativement importante de l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé ce qui peut indiquer que, au terme de notre processus d'isolement des nucléoles, les nucléases nucléolaires restent présentes et actives. Cette observation nous a conduits à définir des conditions d'extraction applicables à basse température (2-4°C).

Enfin, l'agent chimique choisi pour faciliter la dispersion des constituants nucléolaires peut affecter lui aussi la composition et la structure des préribosomes. Deux types d'agents ont été généralement utilisés (soit seuls, soit associés, soit en combinaison avec des tensio-actifs): des polyanions ou le dithiothréitol. Les premiers semblent faciliter la libération des préribosomes par l'enlèvement préalable de certaines protéines nucléolaires de type basique (TAMAOKI -1966- YOSHIKAWA-FUKADA -1967-). Le dithiothréitol, d'autre part, permet de rompre les liaisons disulfures qui peuvent maintenir les RNPs nucléolaires dans une structure plus ou moins continue (WARNER et al.-1967- LIAU et al.-1969- MIRALTO et al.-1971-). La possibilité de modifications, provoquées par ces agents, sur le spectre protéique des préribosomes doit être prise en compte.

Les préribosomes extraits et étudiés doivent être représentatifs de l'ensemble des RNPs nucléolaires. Il est donc nécessaire que leur taux d'extraction soit élevé et que les diverses espèces moléculaires d'ARN nucléolaires soient libérées en proportions similaires pour pouvoir envisager une étude d'ensemble du fonctionnement nucléolaire.

Il faut remarquer que la plupart des procédés décrits pour l'isolement des préribosomes conduisent à une libération relativement difficile de l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé par comparaison aux espèces plus maturées. Ainsi, LIAU et PERRY (1969) extraient du nucléole isolé de cellules L, par action combinée d'un polyanion, le polyvinylsulfate (PVS) et du dithiothréitol (DTT) en présence de Mg^{++} , 44 % de l'ARN nouvellement synthétisé (la durée du marquage a été de 15 minutes, temps au bout duquel la radioactivité incorporée est essentiellement sous forme d'ARN 45S). Par contre, ce taux d'extraction passe à 85 % après un marquage de 75 minutes, dans des conditions où l'ARN 32S est l'espèce marquée majoritaire.

De la même façon, WARNER et SOEIRO (1967), après avoir réalisé la lyse nucléolaire par le DTT en présence d'EDTA, ont constaté des taux d'extraction de 50 et 80 % respectivement pour les ARNs nucléolaires de 45 et 32S. Ces différences d'extractibilité peuvent fournir des renseignements intéressants sur le degré de liaison des divers types de préribosomes avec la trame nucléolaire ou sur leur localisation topographique intranucléolaire (voir 2ème partie de cette thèse). Cependant, ce phénomène peut limiter considérablement l'étude des phases précoces d'élaboration des préribosomes.

En définitive, la mise au point de méthodes d'extraction répondant à l'ensemble des critères qui viennent d'être exposés, apparaît, à l'expérience, extrêmement difficile, sinon impossible. Il importe donc de connaître avec précision les limites de chacune des méthodes pour déterminer celle dont les caractéristiques répondent le mieux à l'étude entreprise.

Pour notre part, nous avons entrepris de définir des conditions d'extraction originales, adaptées aux caractéristiques biochimiques et structurales des nucléoles isolés et pouvant permettre une libération exhaustive des RNPs nucléolaires.

Les résultats suivants ont pu être obtenus : Nous avons défini une méthode nouvelle d'extraction des RNPs nucléolaires, à partir de nucléoles isolés. Ce système de lyse, dans lequel la dissociation de la chromatine nucléolaire est obtenu par action d'un polyanion, l'héparine, permet une libération exhaustive des ARNs nucléolaires, y compris l'ARN nouvellement synthétisé, dans des conditions physicochimiques préservant l'intégrité de ribosomes cytoplasmiques. L'étude biochimique des RNPs nucléolaires extraits a permis d'identifier les espèces 80 et 55S décrites par d'autres auteurs Les caractéristiques ultrastructurales de ces RNPs ont été étudiées en microscopie électronique en vue de définir leur relation avec les RNPs natives qui peuvent être observées in situ.

2 . DESCRIPTION DE LA METHODE DE LYSE DES NUCLEOLES PAR L'HEPARINE .

a) Extraction des composants nucléolaires:

Le but recherché au cours de la mise au point de cette technique était d'obtenir un taux d'extraction maximum des ARNs nucléolaires, dans des conditions physicochimiques pouvant permettre de préserver l'intégrité de ces ARNs et celle des associations spécifiques RNPs. Un polyanion, l'héparine, a été utilisé pour dissocier, à basse force ionique et en présence

d'ion Mg^{++} , la chromatine nucléolaire, grâce à sa forte affinité pour les protéines basiques. Ce traitement facilite l'hydrolyse ultérieure de l'ADN nucléolaire par action de DNAase exogène. Après destruction de la chromatine nucléolaire, la sortie des RNPs nucléolaires est facilitée par un bref traitement par oscillations soniques.

Mode opératoire.

Un culot de nucléoles isolés (environ 10^8 nucléoles) lavés dans le tampon TMK (voir chapitre 1) est remis en suspension dans 0,5 ml de ce tampon TMK. 50 μ l d'une solution d'héparine à 6 % (p/v) dans le tampon TMK sont alors ajoutés. La suspension nucléolaire devient rapidement très visqueuse. On constate au microscope à contraste de phase que les nucléoles gonflent et se désagrègent; ne restent alors visibles que des "fantômes" très peu réfringents. Après 5 minutes d'action de l'héparine, avec agitation fréquente, 50 μ l de solution de DNAase I (Worthington, RNAase free à 2 500 U/mg) à 1 mg/ml dans le tampon TMK sont ajoutés. La viscosité de la suspension diminue rapidement et, après 5 à 10 minutes d'action, la suspension est soumise pendant 10 secondes à effet d'oscillations soniques (appareil RAYTHEON DF 101) puis centrifugée pendant 10 minutes à 25 000 g (SORVALL, rotor SS 34); dans ces conditions de centrifugation, des RNPs de 80 et 55S libres doivent être retrouvées dans le surnageant. Ce surnageant 25 000 g est défini opérationnellement comme "extrait nucléolaire".

TABLEAU 2 : Extraction des constituants nucléolaires
par le traitement par l'héparine.

	ADN	ARN	Protéines
Composition de l'extrait nucléolaire (S 25 000g) en % par rapport aux nucléoles isolés	95	90	65

Les dosages chimiques sont effectués comme décrit p. 21 (Part.I,CH.I).

Ils sont exprimés en % de matériel retrouvé dans le culot 25.000 g par rapport aux nucléoles isolés avant la lyse. L'ADN est dosé selon la technique de BURTON, modifiée par GILES et MYERS, l'ARN par la méthode à l'orcinol (MEJBAUM) et les protéines par la méthode au biuret, décrite par GORNALL, ou par la méthode de LOWRY. Si les acides nucléiques sont extraits à plus de 90 %, il faut noter qu'une importante fraction des protéines nucléolaires de départ, environ 35 %, sont retrouvées dans ce culot 25 000 g et doivent donc rester liées à des structures hautement organisées de dimensions relativement importantes. La possibilité que cette fraction protéique corresponde à des éléments de la trame protéique nucléolaire sera examinée ultérieurement. A ce propos, il convient de noter que lorsque les protéines cellulaires ont été marquées à la L-leucine (^3H) pendant un temps relativement court (moins d'une heure), le taux d'extraction de protéines marquées est supérieur à celui qui est mesuré par dosage chimique ou par marquage long (plus de 24 heures): 85 % au lieu de 65 %. Il semble donc que ces protéines non-extraites se différencient des autres protéines nucléolaires par un temps de renouvellement plus long.

Extraction de l'ARN nucléolaire.

Si les cellules d'hépatome ascitique sont marquées à l'uridine (^3H) pendant des temps variables, le taux d'extraction de l'ARN marqué reste toujours compris entre 90 et 95 %, même pour des pulses courts de 3 minutes, les éléments contenant l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé sont donc, eux aussi, extraits de façon quasi exhaustive. En utilisant des systèmes de lyse nucléolaire différents, plusieurs auteurs (WARNER et al.-1967- LIAU -1968-) ont pu constater une extraction moins facile des éléments les moins maturés. A partir du système que nous décrivons ici, nous avons pu définir des conditions de lyse nucléolaire ménagée qui nous ont aussi permis d'observer un phénomène analogue (voir 2ème partie de cette thèse, chapitre 2).

b) Effet des conditions d'extraction sur les ribosomes cytoplasmiques.

Il importe de déterminer autant que possible l'effet du système de lyse nucléolaire sur les caractéristiques physicochimiques des préribosomes natifs. Les critères d'intégrité ne peuvent actuellement être définis que de façon très incomplète ^{pour} des préribosomes. Par contre, pour le produit final de leur maturation, le ribosome cytoplasmique, la notion d'intégrité physicochimique peut être définie assez précisément en relation avec l'aptitude à réaliser un ensemble de fonctions bien caractérisées au cours de leur participation à la synthèse des protéines, qui peut être étudiée in vitro sur des systèmes acellulaires. C'est donc sur le ribosome cytoplasmique que nous avons entrepris de déterminer l'effet des conditions d'extraction des RNPs nucléolaires.

Des ribosomes cytoplasmiques, isolés dans des conditions physicochimiques préservant leur intégrité fonctionnelle, ont été traités dans les conditions utilisées pour obtenir la lyse nucléolaire puis leur composition et leur vitesse de sédimentation ont été déterminées et comparées à celles de ribosomes non traités.

Mode opératoire.

Des ribosomes sont préparés à partir de cellules d'hépatome ascitique dans les conditions décrites dans le chapitre précédent. Les fractions ribosomiques, obtenues sous forme de culot 100 000 g, contiennent les polysomes, les monomères 80S et des sous-unités 60 et 40S. Ces fractions ribosomiques sont remises en suspension dans le tampon TMK par agitation au Potter. Les agrégats non dispersés sont éliminés par 10 minutes de centrifugation à 15 000 g (SORVALL rotor SS 34). Des parties aliquotées sont alors traitées par diverses concentrations d'héparine, puis par la DNAase (concentration finale : 100 µg/ml) pendant 15 minutes environ. Après 10 secondes de sonication (RAYTHEON DF 101), ces parties aliquotées sont déposées sur 5 ml d'un gradient 15-30 % de saccharose dans le tampon TMK et analysées par 2 heures de centrifugation à 42 000 t/mn (rotor SPINCO SW 50). Après centrifugation, le profil en densité optique à 260 nm est déterminé. Les fractions sédimentant plus de 30S sont alors recueillies par 3 heures de centrifugation à 150 000 g après dilution dans le tampon TMK. Le contenu protéique du culot obtenu est analysé par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 10 % en présence de SDS selon le procédé décrit par WARNER (1967) et coloration par l'ami-

do-schwartz. L'ARN est extrait comme décrit dans le chapitre précédent puis analysé par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose.

Résultats :

Les diagrammes obtenus après séparation des protéines par électrophorèse sont identiques : les différentes espèces moléculaires présentes dans les ribosomes témoins sont retrouvés, dans des proportions analogues, dans les fractions ribosomiques traitées, les ARNs ribosomiques de 18 et 28S conservant leurs vitesses de sédimentation primitives. Par contre la distribution des ribosomes entre polysomes, monomères et sous-unités est modifiée par l'héparine, de façon d'autant plus nette que sa concentration est plus élevée (fig. 3)

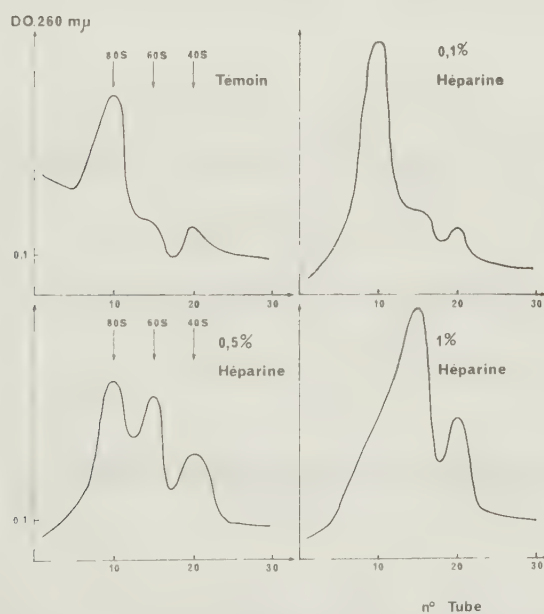


FIG. 3 — Action de l'héparine sur les ribosomes cytoplasmiques. Des fractions aliquotes d'une suspension de ribosomes dans le tampon TMK sont traitées par les concentrations indiquées (poids/volume) d'héparine et analysées par centrifugation dans un gradient de saccharose 15-30 p. 100 dans le tampon TMK, rotor Spinco SW 50, 2 h à 41.500 t/min.

Cet effet (diminution de la proportion des polysomes et augmentation corrélative de la proportion de monomères 80S puis de sous-unités 60S et 40S) est analogue à celui qu'on peut obtenir par réduction de la concentration en Mg^{++} dans le milieu de séparation. Il semble qu'il puisse correspondre au déplacement progressif, sous l'effet de concentrations croissantes d'héparine, d'ions Mg^{++} engagés dans le maintien de la structure tridimensionnelle des ribosomes.

Dans nos conditions expérimentales, le devenir des mRNPs contenant l'ARN messager lié aux polysomes, n'est pas suivi (les protéines qui leur sont liées ne sont présentes qu'en proportion très faible par rapport aux protéines strictement ribosomiques).

En conclusion, les conditions d'extraction nucléolaire utilisées ne modifient pas de façon sensible la composition physicochimique des ribosomes, seule la répartition entre les diverses formes structurales étant affectée.

Nous avons donc entrepris l'étude des éléments extraits du nucléole dans les conditions qui sont décrites plus haut, la concentration de 0,5 % d'héparine étant la concentration minimum de polyanion permettant l'extraction exhaustive des ARNs nucléolaires.

3 . ANALYSE DES ELEMENTS EXTRAITS DU NUCLEOLE ISOLE .

Mode opératoire :

Une partie aliquote (jusqu'à 350 μ l) de l'extrait nucléolaire (surnageant 25 000 g) est déposée sur 5 ml d'un gradient 15-30 % de saccharose préparé dans le tampon TMK. Après deux heures de centrifugation à 42 000 t/mn, des fractions de 3 gouttes sont collectées et la densité optique à 260 nm est mesurée. La radioactivité est mesurée directement au spectromètre à scintillation Packard après addition de 10 ml de liquide scintillant. En effet, dans nos conditions expérimentales (concentrations de précurseurs radioactifs lors du marquage des cellules, mode de fraction-

nement cellulaire utilisé), la radioactivité retrouvée dans les nucléoles isolés après marquage des acides nucléiques ou des protéines est exclusivement sous forme TCA-précipitable.

a) Analyse en densité optique :

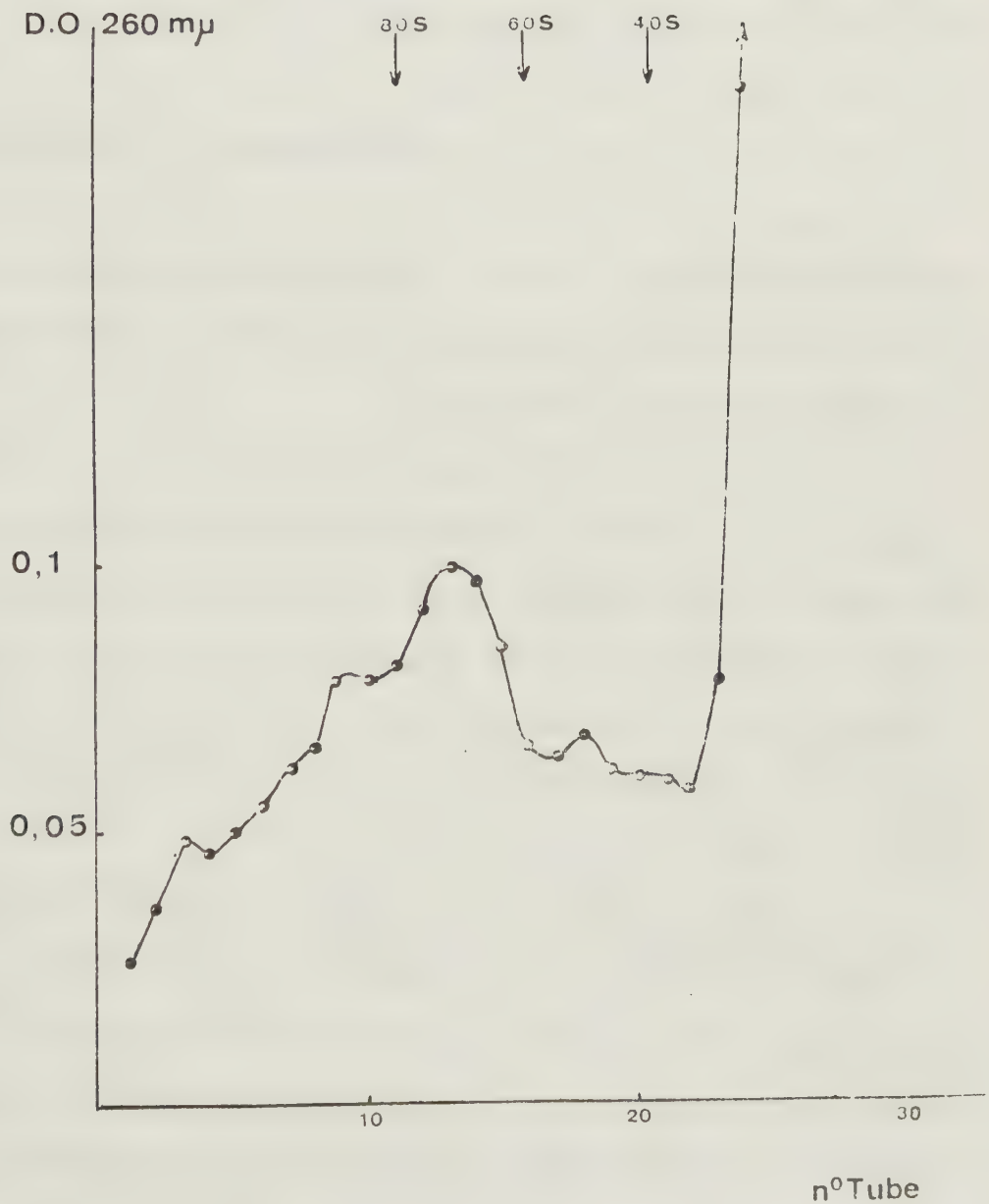


Fig. 4

La mesure des densités optiques à 260 nm sur les fractions obtenues après ultracentrifugation sur gradient, en présence de Mg^{++} (tampon TMK), fait apparaître plusieurs pics d'absorption. Les vitesses de sédimentation ont été évaluées par référence à des ribosomes cytoplasmiques analysés dans les mêmes conditions (monomères 80S et sous-unités 40 et 60S). Un pic principal se localise autour de 70S, des pics moins nets ou des épaulements peuvent être détectés dans les régions 50, 90 et 110S. Une part importante du matériel nucléolaire extrait absorbant à 260 nm est récupérée dans les dernières fractions de gradient (constantes de sédimentation inférieures à 15S). Nous verrons par la suite que ces dernières fractions contiennent, outre les déoxynucléotides résultant de l'hydrolyse du DNA nucléolaire par le traitement à la DNAase, une part importante des protéines nucléolaires extraites.

Une indication préliminaire sur le contenu relatif des fractions du gradient en protéines et acides nucléiques est apportée par les valeurs des rapports $\frac{\text{d.o. à } 260 \text{ nm}}{\text{d.o. à } 280 \text{ nm}}$. La valeur de ce rapport est voisine de 1,70 pour les différentes fractions sédimentant à plus de 15S : c'est une valeur voisine de celle qui est déterminée pour des ribosomes cytoplasmiques. Par contre, pour les dernières fractions du gradient (sédimentant à moins de 20S), ce rapport n'est que de 1,20.

Quand la séparation de l'extrait nucléolaire est réalisée dans des conditions identiques aux précédentes, mais en l'absence d'ion Mg^{++} et présence d'EDTA, le profil en densité optique est modifié : la dispersion relative observée dans le cas précédent est réduite. Un pic principal se localise à 55S environ avec un épaulement net vers 80S. Nous montrerons plus loin, par analyse directe, que les éléments qui, en présence de Mg^{++} , ont des vitesses de sédimentation comprises entre 110S et 50S, se retrou-

vent, en l'absence de Mg^{++} (et présence d'EDTA), dans les fractions 80, 65 et 55S. La localisation dans les dernières fractions du gradient d'une proportion importante des éléments extraits du nucléole n'est pas sensiblement modifiée par la présence ou l'absence d'ion Mg^{++} lors de la séparation.

L'étude biochimique qui est décrite plus loin nous a permis de préciser que l'ARN nucléolaire extrait était isolé sous forme de complexes RNPs. Divers types de RNPs ont été analysés et caractérisés d'après leur contenu en ARN et en protéines. L'étude ultrastructurale des formes RNPs isolées a été entreprise par microscopie électronique.

b) Détection après marquage de l'ARN .

I. Les cellules d'hépatome ascitique du rat en culture in vitro sont marquées pendant 30 minutes par incorporation d'uridine (3H). Ce temps d'incorporation permet de marquer préférentiellement l'ARN nucléolaire de type 45S.

Les éléments extraits des nucléoles isolés par traitement par l'héparine sont analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité en présence d'ion Mg^{++} , soit en l'absence d'ion Mg^{++} et présence d'EDTA.

Analyse en présence de Mg^{++} (voir fig. I du chap. suivant):

Le profil de radioactivité est relativement polydispersé. Les espèces repérées précédemment par mesure de densité optique apparaissent toutes notablement marquées, en particulier celles sédimentant dans la zone 90-110S.

Analyse en l'absence de Mg^{++} (voir fig. 2b du chap. suivant)

La radioactivité incorporée en ARN se retrouve préférentiellement au niveau des éléments sédimentant vers 80S, avec un épaulement dans la région 55S. Le rapport de marquage entre ces deux espèces est proche de

celui observé, pour l'ARN nucléolaire total, entre les espèces moléculaires 45 et 32 S.

II. Les cellules d'hépatome ascitique sont marquées par l'uridine (^3H) pendant un temps plus long. Après 4 heures d'incorporation, les divers types d'ARNs nucléolaires ont des radioactivités spécifiques très voisines : après analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose, le profil en radioactivité de l'ARN recouvre le profil en densité optique à 260 nm. Dans ces conditions, l'espèce nucléolaire la plus abondante est l'ARN 32S.

Quand les éléments nucléolaires extraits par le traitement à l'héparine sont analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose, on observe, pour la zone correspond à des vitesses de sédimentation supérieures à 20S, une grande similitude entre les profils de radioactivité et de densité optique à 260 nm, que la séparation soit effectuée en présence ou en l'absence d'ion Mg^{++} .

a) Analyse en présence d'ion Mg^{++} , un pic principal apparaît dans le profil en radioactivité vers 70S (fig. 5 a). Des épaulements peuvent être décelés vers 90 et 110S.

b) Analyse en l'absence de Mg^{++} (et présence d'EDTA) :

La majeure partie de la radioactivité sédimente vers 55S avec un épaulement vers 80S (fig. 5 b).

Dans les deux cas (absence ou présence d'EDTA) les éléments sédimentant à moins de 20S, ne représentent qu'une faible proportion de la radioactivité incorporée en ARN.

Analyse de l'ARN:

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'ARN marqué qui peut être extrait des RNPs nucléolaires après 4 heures d'incorporation d'uridine (^3H) par les cellules entières, montre que les fractions 80 et 55 S (en présence d'EDTA) contiennent essentiellement de l'ARN 45 et 32 S respectivement.

Le spectre en ARN des diverses formes séparées en présence de Mg^{2+} apparaît relativement complexe : les espèces 45 et 32 S sont présentes toutes les deux dans chaque type, mais dans des proportions variables. La proportion d'ARN 45 S est d'autant plus élevée que les RNPs ont une vitesse de sédimentation plus importante.

4. EFFET DE L'ION Mg^{2+} SUR LA SEPARATION DES ELEMENTS SUBNUCLEOLAIRES.

En vue de définir les correspondances entre les différentes espèces mises en évidence dans ces deux conditions d'analyse, l'expérience suivante a été réalisée :

Les éléments extraits du nucléole, après marquage des cellules entières par 4 heures d'incorporation d'uridine (^3H), ont été analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose en présence d'ion Mg^{++} . Des parties aliquotes de différentes fractions de ce premier gradient ont été déposées sur un second gradient de densité de saccharose, préparé dans le milieu NEB (absence d'ion Mg^{++} et présence d'EDTA), et séparés par ultracentrifugation comme précédemment. Les résultats sont montrés fig. 6. Le profil en radioactivité du premier gradient est décrit fig. 6 a. Les profils obtenus par resédimentation en présence d'EDTA des fractions 110, 90 et 70S sont montrés fig. 6 b, c, d).

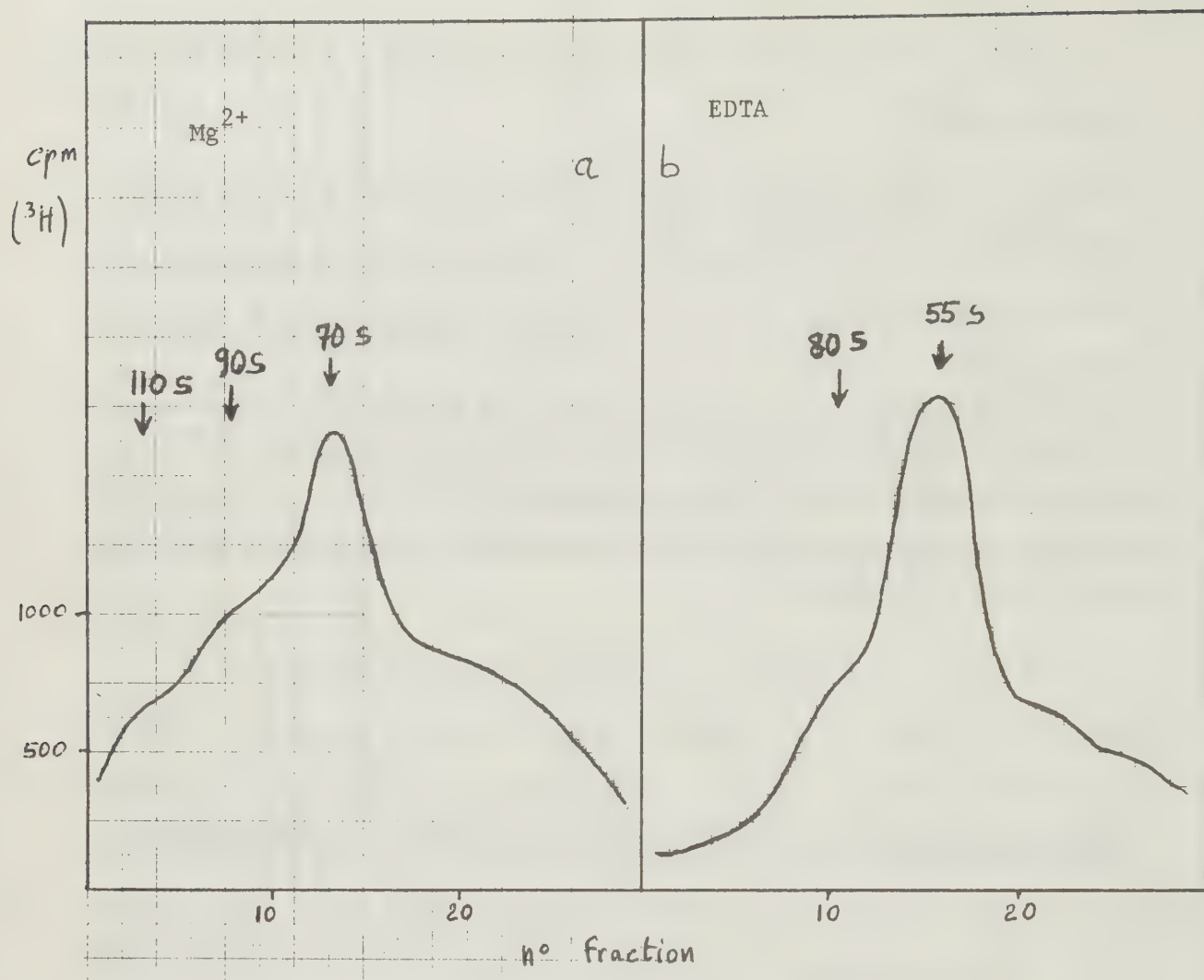


Figure 5 : Analyse des RNPs nucléolaires extraites par l'héparine.

Les cellules CHO ont été marquées pendant 4 heures par incorporation d'uridine (³H). Les éléments extraits du nucléole sont séparés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose (15-30%) soit :

- a) en présence d'ion Mg²⁺
- b) en présence d'EDTA .

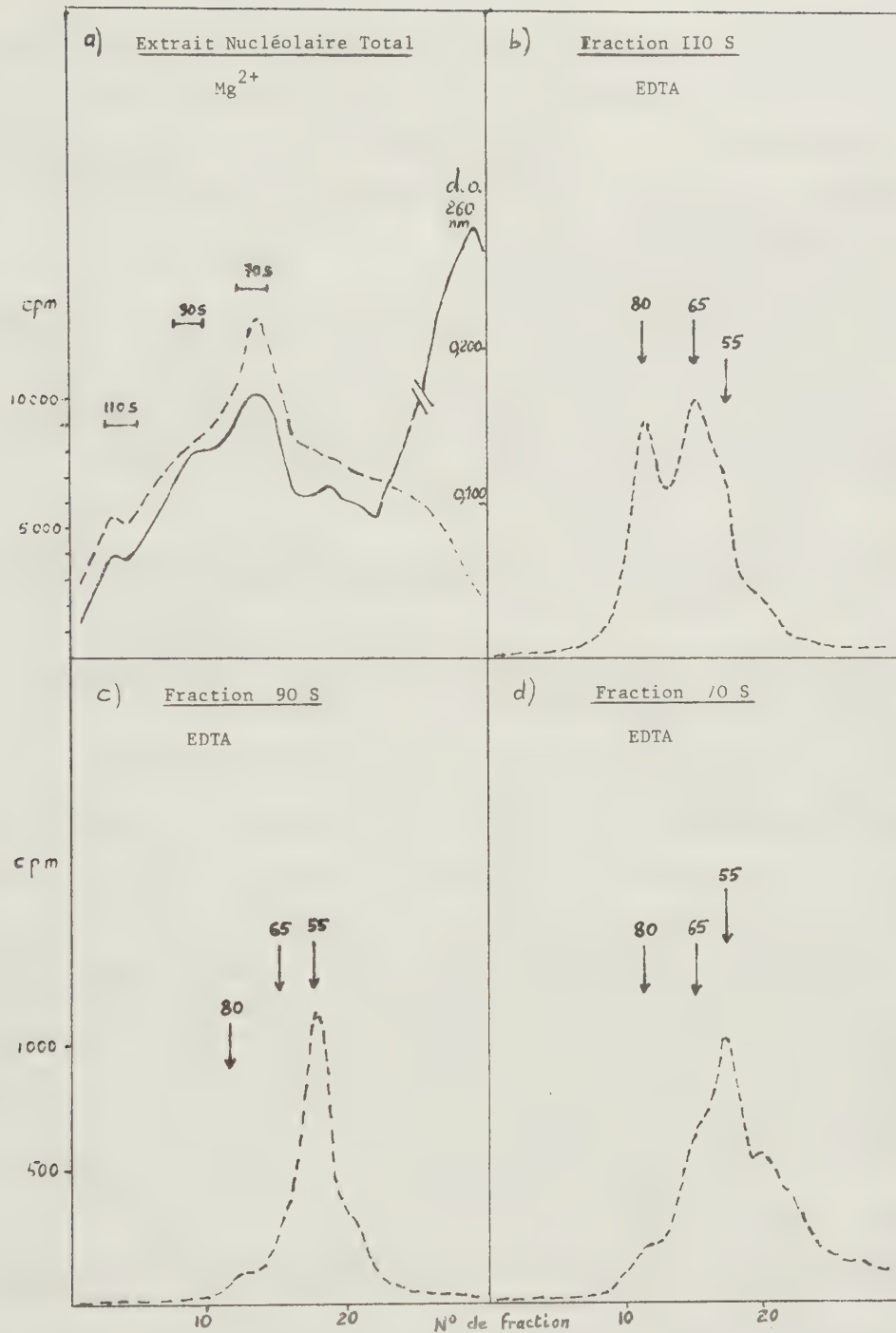


Fig. 6 Resédimentation en présence d'EDTA des RNPs nucléolaires obtenues en présence de Mg^{2+} .

a) Profil de l'extrait nucléolaire total séparé en présence de Mg^{2+} .
b, c et d) Resédimentation en présence d'EDTA de différentes fractions du gradient de la figure a.

Les cellules C.H.O. ont été marquées pendant 4 heures par incorporation d'uridine (3H) :

a) Séparation sur un gradient de saccharose (15-30%) dans le tampon TMK
b, c, d) Séparation sur un gradient de saccharose (15-30%) dans le tampon NEB

Centrifugation pendant 2 heures à 42000t/mn (rotor Spinco SW50).

----- : cpm ; ----- : d.o. à 260 nm.

Il apparaît, en définitive, que chacune des fractions " Mg^{2+} " étudiées, dans la zone 50-110 S, se résout à la fois en éléments de 80, 65 et 55 S quand la séparation est effectuée en présence d'EDTA. Seules varient, selon la nature de la fraction " Mg^{2+} " considérée, les proportions relatives des 3 formes 80, 65 et 55 S.

Dans nos conditions expérimentales, l'analyse directe par ultracentrifugation sur gradient de saccharose en présence d'EDTA de l'ensemble de l'extrait nucléolaire ne permet pas de détecter la forme 65 S, entre l'espèce majeure 55 S et l'épaulement 80 S. L'existence d'éléments isolés de type 65 S (en présence d'EDTA) a déjà été signalée par LIAU et PERRY (1969), après extraction des RNPs en présence d'ion Mg^{2+} .

Une autre série d'expériences a permis d'établir la nature RNP des éléments isolés au niveau desquels se retrouvent les ARNs nucléolaires.

5. NATURE RNP DES ELEMENTS CONTENANT L'ARN PRERIBOSOMIQUE

a) Répartition des protéines nucléolaires:

Les cellules d'hépatome sont marquées pendant 20 minutes par incorporation de L-leucine (3H). Les éléments subnucléolaires extraits (représentant 85 % de la radioactivité présente dans les nucléoles isolés) sont analysés comme précédemment, soit en présence, soit en absence d'ions Mg^{++} (et présence d'EDTA). Dans les deux cas, le profil en radioactivité qui est obtenu est analogue à celui de densité optique à 260 nm :

- en présence de Mg^{++} , pic principal vers 70S avec épaulements vers 110, 90 et 50 S.
- en l'absence de Mg^{++} (et présence d'EDTA), pic majeur 55S et épaulement 80S;

Dans les deux cas, une proportion importante de protéines nucléolaires marquées est retrouvée dans les fractions sédimentant à moins de 20S.

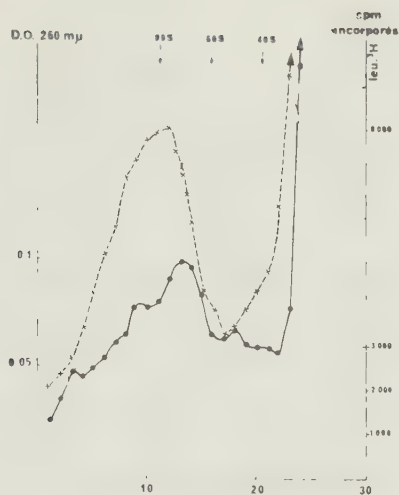


FIG. 7. — Analyse du surnageant 25.000 g d'un lysat nucléolaire provenant de cellules cultivées *in vitro* et marquées 20 min par la L-Leucine (^3H) ($1 \mu\text{Ci/ml}$). Centrifugation en gradient de saccharose 15-30 p. 100 dans le tampon TMK, rotor Spinco SW 50 pendant 2 h à 41.500 t/min.
 ● — D.O.
 --- ● — leucine ^3H .

L'exacte superposition des profils de marquage qui peut être observée pour les protéines et pour l'ARN suggèrent fortement que l'ARN nucléolaire retrouvé dans ces éléments à vitesse de sédimentation élevée est intégré dans des complexes RNPs.

En vue de déterminer si cette coïncidence n'est pas fortuite, et si l'ARN extrait est bien lié à des protéines, deux voies

expérimentales ont été utilisées .

D'une part, nous avons examiné l'effet de traitements enzymatiques définis, appliqués à l'extrait nucléolaire, sur les vitesses de sédimentation des éléments qui contiennent l'ARN nucléolaire extrait. Par ailleurs, nous avons mesuré la densité de flottation de ces éléments. La valeur de ce paramètre permet de distinguer un ARN "nu" d'un ARN complexé à des protéines et permet d'apprécier, de plus, la teneur en protéines d'un éventuel complexe RNP.

b) Effets de traitements enzymatiques sur la répartition des éléments extraits du nucléole.

Les cellules d'hépatome ascitique sont marquées pendant 4 heures par incorporation d'uridine (^3H). Les nucléoles isolés sont soumis au traitement par l'héparine puis l'extrait nucléolaire est soumis à l'action d'une faible concentration RNA ase ($3 \mu\text{g/ml}$), pendant 5 minutes. Ces conditions permettent une hydrolyse extensive d'un ARN non "habillé" par des protéines. On peut, dans ces conditions d'hydrolyse, dissocier les polysomes

en provoquant des coupures au niveau de la molécule d'ARN messager, sans que les monomères ribosomiques soient extensivement dissociés.

L'extrait nucléolaire traité par la RNA ase est alors analysé par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose. Le profil de radioactivité n'apparaît pas modifié, par rapport à un extrait nucléolaire non traité. Il semble donc que l'ARN est protégé de l'hydrolyse, ou bien que, même dans le cas d'une hydrolyse partielle, les fragments formés restent maintenus dans une structure à vitesse de sédimentation élevée, par l'intervention de protéines qui seraient complexées à l'ARN nucléolaire. Cette hypothèse est confirmée expérimentalement de la façon suivante : l'extrait nucléolaire, dont l'ARN est marqué comme dans le cas précédent, est soumis à un traitement par la protéase avant d'effectuer l'incubation en présence d'une faible concentration ^{de} RNA ase (3 µg/ml). Après analyse par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose, le profil en radioactivité est complètement modifié : le marquage se localise essentiellement au niveau des dernières fractions (sommet) du gradient, tandis que la zone 80-55S n'est pratiquement plus marquée.

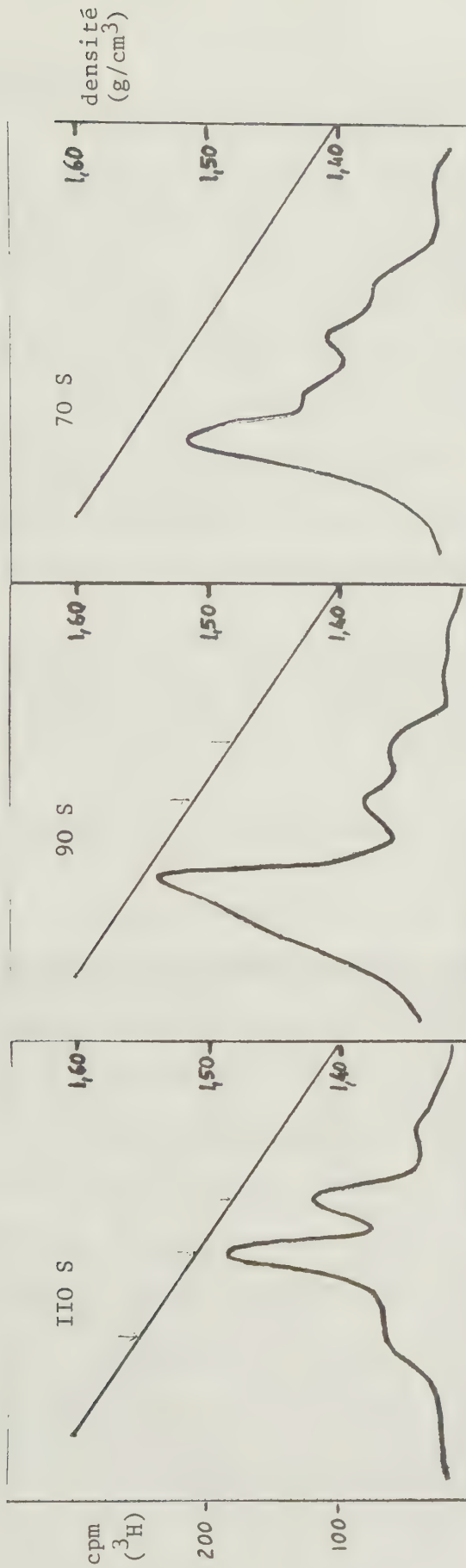


Fig. 8: DENSITE DE FLOTTATION DES RNPs NUCLEOLAIRES .

Les RNPs nucléolaires sont isolées de cellules C.H.O. marquées par 4heures d'incorporation d'uridine(^3H).Après traitement des nucléoles isolés par l'héparine, les éléments extraits sont séparés par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, dans les conditions décrites fig. 5 . Les fractions choisies sont fixées par le glutaraldéhyde puis centrifugées sur un gradient préformé (33-55%) de CsCl . Après centrifugation, les densités sont déterminées sur des parties aliquotes par mesure de l'indice de réfraction.

c) Mesure de la densité de flottation.

Elle est effectuée sur les éléments nucléolaires contenant l'ARN, séparés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose. Des parties aliquotes des fractions recueillies sont analysées par ultracentrifugation isopycnique réalisée dans une solution concentrée de chlorure de césium. Cette analyse implique la stabilisation préalable des éventuels complexes RNPs contre l'effet dissociant de concentrations élevées de CsCl qui sont nécessaires. La fixation est généralement obtenue par action d'un aldéhyde. La méthode que nous avons utilisée est celle décrite par BALTIMORE et al. (1968). La fixation est obtenue au moyen d'un réactif bifonctionnel, le glutaraldéhyde.

Mode opératoire :

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique marquées par 4 heures d'incorporation d'uridine (^3H). Les éléments extraits des nucléoles par le traitement à l'héparine sont séparés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose en présence d'ion Mg^{++} (milieu TMK). Les fractions correspondant aux vitesses de sédimentation 110S, 90 S et 70 S sont respectivement rassemblées puis fixées par addition de glutaraldéhyde (neutralisé par NaHCO_3) à une concentration finale de 6 %. 350 μl de chaque suspension fixée sont alors déposés sur 5 ml d'un gradient préformé 33-55% de CsCl dans un tampon RSB (Tris-HCl, 10 mM pH 7,4; NaCl 10 mM; MgCl_2 1,5 mM) contenant 0,8 % de Brij 58. Ce détergent non-ionique permet d'éviter des pertes de matériel par adsorption sur les tubes en nitrate de cellulose. Après 16 heures de centrifugation à 40 000 t/mn (rotor SPINCO SW 50.1), des fractions de 10 gouttes sont recueillies et précipitées par le TCA (10 %). Le précipité est ensuite recueilli sur filtre GF/B de façon à éliminer le CsCl qui, à concentration élevée, trouble le liquide scintillant et perturbe ainsi les mesures de radioactivité. Après lavage des filtres au TCA (10 %), la radioactivité est mesurée au spectromètre PACKARD en utilisant 10 ml de liquide scintillant. La pente du gradient de densité est déterminée par mesure de l'indice de réfraction sur des parties aliquotes des fractions de gradient.

Résultats :

Pour chacune des fractions considérées, la quasi totalité de l'ARN marqué est retrouvé dans divers types d'éléments, dont la densité moyenne est de l'ordre de 1,52 g/cm³.

Un ARN "nu" a une densité moyenne voisine de 1,90 g/cm³ tandis que celle des protéines libres est de l'ordre de 1,25 g/cm³.

Il apparaît donc que l'ARN nucléolaire que nous avons isolé est intégré dans des complexes RNPs dans lesquels les protéines représentent une part importante de la masse globale de la particule (de l'ordre de 50 %).

En première approximation, en admettant l'additivité des volumes pour les protéines et l'ARN intégrés dans des éléments RNPs, la densité de la particule RNP est directement reliée au rapport entre la masse en protéines, m_p , et sa masse en ARN, m_a , par la relation :

$$\rho_{RNP} = \frac{1 + \frac{m_a}{m_p}}{\frac{1}{\rho_p} + \frac{m_a}{m_p} \times \frac{1}{\rho_a}}$$

Une teneur égale en protéines et en ARN ($\frac{m_a}{m_p} = 1$) correspondrait alors à une densité de 1,51 g/cm³.

Plus précisément, chacune des trois fractions étudiées, extraites du nucléole et séparées en présence de Mg^{++} , se résout essentiellement en trois types d'éléments RNPs de densités 1,48, 1,51 et 1,56 g/cm³ qui sont présents en proportions variables selon la fraction considérée.

Des ribosomes cytoplasmiques ont été isolés de cellules CHO, après 24 heures de marquage de l'ARN par incorporation d'uridine (³H), puis ont été fixés et analysés dans les mêmes conditions. La densité obtenue, 1,55 g/cm³ est proche de celle obtenue par d'autres auteurs.

En définitive, d'après ces résultats et ceux de la fig. 8, il semble que les formes nucléolaires sédimentent à 80S, 65S et 55S en présence d'EDTA correspondent respectivement aux espèces de densité 1,48, 1,51 et 1,56 g/cm³. dont les rapports $\frac{\text{Protéine}}{\text{ARN}}$, calculés d'après la relation précédente sont de 1,20, 1 et 0,72.

d) Analyse par électrophorèse des protéines liées à l'ARN préribosomique.

L'analyse fine du spectre protéique des divers types de RNPs reste difficile, du fait des faibles quantités de protéines disponibles, du nombre élevé d'espèces moléculaires qui sont présentes et des limites techniques à l'obtention de radioactivités spécifiques élevées par marquage *in vivo*.

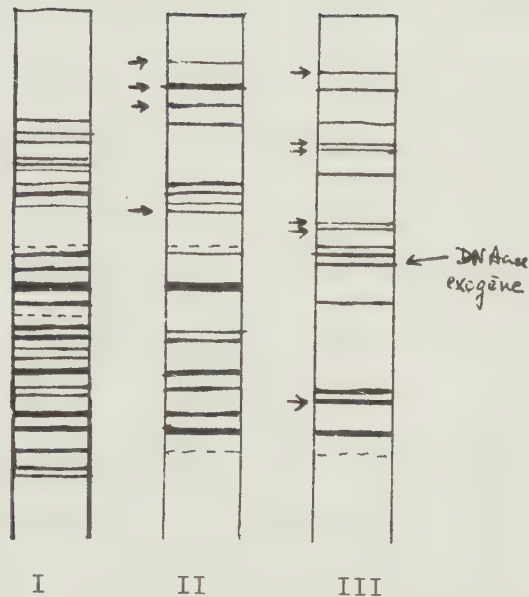
Pour ces diverses raisons, c'est l'ensemble des fractions sédimentant entre 80 et 55S en présence d'EDTA qui a été globalement étudié dans une analyse préliminaire.

Les protéines des ribosomes cytoplasmiques isolées des mêmes cellules ont été analysées parallèlement par la même technique -électrophorèse sur gel d'acrylamide (à 10 %) en présence de SDS (la mobilité est alors fonction de la masse molaire de la protéine) selon la technique décrite par WARNER (1967).

Après coloration par l'amidoschwartz, il est possible de détecter, dans les fractions RNPs nucléolaires considérées, un nombre élevé de bandes distinctes (plus de 20). Certaines ont des mobilités identiques à des protéines ribosomiques cytoplasmiques. D'autres bandes n'ont pas d'homologues chez les protéines ribosomiques cytoplasmiques et inversement, un nombre important de protéines ribosomiques cytoplasmiques n'ont pas d'homologues dans les protéines des RNPs nucléolaires.

Un second type d'analyse a été effectué après marquage *in vitro* : il a permis de préciser le spectre protéique individuel des éléments 80 et 55S.

La fixation d'¹²⁵Iode sur les groupements tyrosine des protéines -catalysée *in vitro* par la lactoperoxydase- permet d'obtenir des protéines marquées dont la radioactivité spécifique est très élevée, ce qui facilite leur détection.



Analyse par électrophorèse des protéines des RNPs nucléolaires.

Les protéines des RNPs nucléolaires (80 et 55S rassemblées) extraites par traitement par l'héparine sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10 %) en présence de SDS puis colorées par l'amido-Schwartz (II). Les protéines des ribosomes cytoplasmiques (I) et les protéines extraites des nucléoles et retrouvées dans les fractions à faible vitesse de sédimentation ($< 20S$) analysées dans les mêmes conditions

- : pour II, bandes supplémentaires par rapport aux ribosomes cytoplasmiques.
- : pour III, bandes supplémentaires par rapport aux RNPs nucléolaires de 80 et 55S.



Fig. 9 : ANALYSE PAR ELECTROPHORESE DES PROTEINES DES RNPs NUCLEOLAIRES .

Les fractions 80 et 55 S (en présence d'ED1A) des RNPs nucléolaires extraites de nucléoles de cellules C.H.O. par traitement par l'héparine sont recueillies après ultracentrifugation sur gradient de saccharose. Les protéines extraites sont iodées *in vitro* (^{125}I) en présence de lactopéroxydase, puis analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10%), en présence de SDS. Les protéines de ribosomes cytoplasmiques sont traitées et analysées dans les mêmes conditions (---).

Nous avons appliqué cette technique aux protéines des RNPs nucléolaires et à celles des ribosomes cytoplasmiques. Ces éléments RNPs, isolés comme décrit précédemment, ont été traités dans des conditions (présence d'EDTA et de concentrations élevées de cation monovalent, Na^+) qui doivent induire un dépliement maximum du complexe RNP (dont certaines protéines peuvent en outre être détachées) de manière à obtenir une accessibilité maximum des divers sites réactionnels.

Après marquage *in vitro*, les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et le profil en radioactivité est déterminé (fig. 9).

On peut constater qu'un certain nombre d'espèces protéiques à haute masse molaire (région A) présentes dans les RNPs 80S n'apparaissent pas dans les RNPs de 55S.

Par contre, les profils dans les régions Bet C présentent de grandes analogies pour les deux types de RNPs nucléolaires.

Le profil obtenu pour les protéines des ribosomes cytoplasmiques est également, dans la région C (masses molaires peu élevées), très ressemblant à celui des deux types de RNPs nucléolaires.

Il semble donc qu'un nombre élevé de protéines ribosomiques se fixent dans le nucléole à l'ARN préribosomique. Les RNPs nucléolaires contiennent en outre des protéines à masse molaire élevée qui ne se retrouvent pas ultérieurement au niveau des ribosomes cytoplasmiques.

Ce résultat est tout à fait en accord avec ceux décrits par KUMAR et WARNER (1972) sur des RNPs nucléolaires isolées de cellules HeLa.

6. ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DES RNPs NUCLEOLAIRES ISOLEES.

Cette étude a été réalisée en étroite collaboration avec le Professeur SIMARD (Laboratoire de Biologie Cellulaire, CHU de Sherbrooke, Canada) qui a largement contribué à l'interprétation des résultats. La plupart des résultats qui vont être exposés ont fait l'objet d'une publication (SIMARD, SAKR et BACHELLERIE -1973-).

a) En présence d'ion Mg^{++} .

Les RNPs nucléolaires extraites après traitement par l'héparine ont été isolées sur gradient de densité de saccharose en présence d'ion Mg^{++} . Des fractions de gradient ont été colorées par l'acétate d'uranyle à 2 %.

Technique :

Une goutte de la fraction de gradient est déposée sur un treillis de cuivre (300 mesh) recouvert d'une membrane de Formvar et d'un film de carbone. Au bout de 30 secondes, le treillis est séché au papier filtre puis lavé 2 à 3 fois avec une goutte de tampon TMK. Le treillis est ensuite coloré par une goutte d'acétate d'uranyle à 2 % pendant 15 secondes.

A un grossissement de 120 000; la fraction 70S présente un aspect relativement homogène. On peut reconnaître un type majeur de particule dont les dimensions extrêmes sont, en moyenne, de 230 Å et 190 Å (diamètres maximum et minimum). Ces dimensions sont légèrement inférieures à celles obtenues pour les ribosomes cytoplasmiques (monomère de 80 S) analysés dans les mêmes conditions expérimentales: 260 - 210 Å (voir fig. 10).

Dans ces conditions de traitement et d'isolement, l'image obtenue en microscopie électronique varie fréquemment entre une coloration négative et une coloration positive. Un phénomène analogue a été constaté pour les ribosomes cytoplasmiques dans les mêmes conditions de préparations.

Quand l'image est obtenue en coloration positive, les particules élémentaires qui sont présentes dans la fraction "70S, Mg^{++} " s'organisent

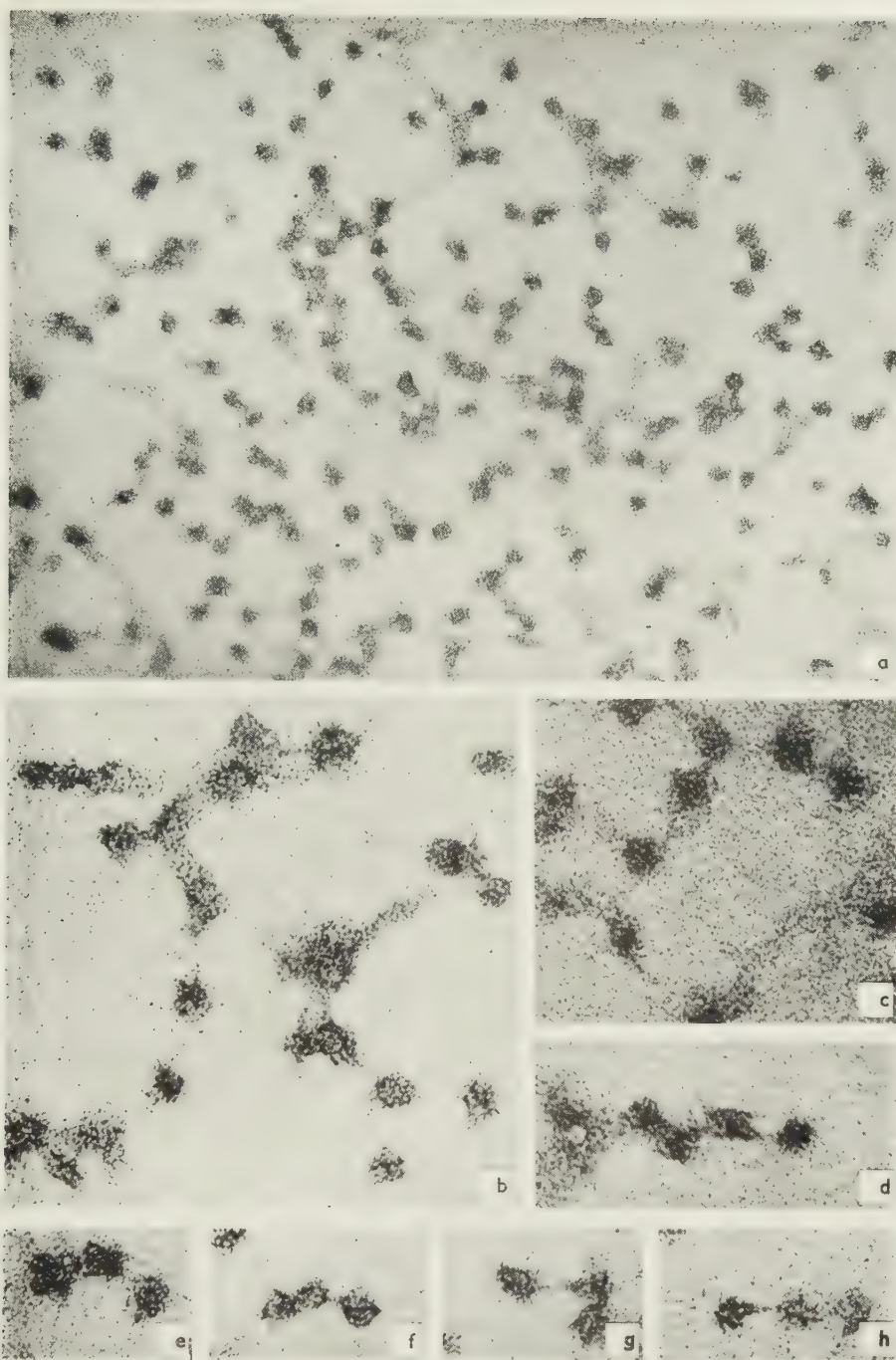


PLANCHE 1 : RNPs nucléolaires de 70S (en présence de Mg^{++}) isolées après

traitement par l'héparine. Les particules non fixées sont colorées pendant 15 secondes à l'acétate d'uranyle à 2 %. Dans ces conditions expérimentales, les particules apparaissent généralement en coloration positive.

a) x 120 000 : sur un champ étendu, les particules apparaissent fréquemment reliées entre elles par un mince filament.

b, c, d) x 250 000.

e, f, g, h) x 250 000. Des groupements plus compacts de particules (général. de 3) peuvent être distingués.

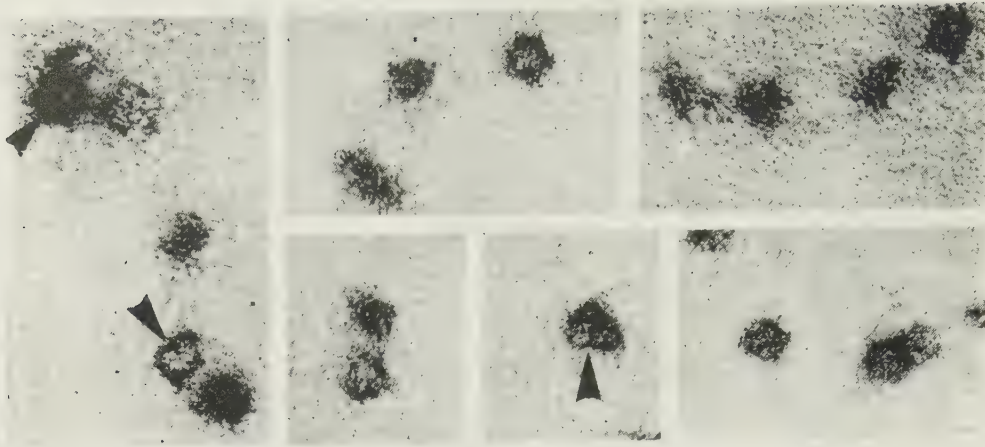


PLANCHE 2 : RNPs nucléolaires de 70S : particules isolées observées en coloration négative.

La forme apparaît assez irrégulière. Certaines particules sont séparées par une fissure (flèche) mais l'examen systématique d'un grand nombre de ces éléments ne permet pas de lui attribuer une position précise en relation avec l'existence éventuelle d'un arrangement par sous-unités (x 250 000).

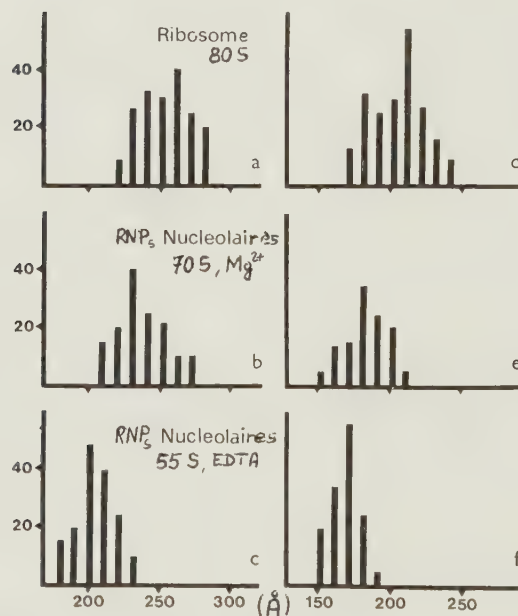


FIGURE 10 : Dimension des particules nucléolaires.

Les histogrammes ont été déterminés par les RNPs de la fraction "70S, Mg^{++} " (b, e), pour ceux de la fraction "55S, EDTA" et pour les ribosomes cytoplasmiques, monomères de 80S, des mêmes cellules (a, d). Le diamètre maximum (fig. a, b, c) et le diamètre minimum (fig. d, e, f) sont mesurés sur des micrographes électroniques agrandis 3 fois.

d'une manière caractéristique : on peut observer fréquemment des arrangements linéaires de plusieurs particules, reliées par un filament qui est coloré positivement par l'acétate d'uranyle (Planche 1). Ce filament mesure environ 10 à 15 Å d'épaisseur. Au niveau de ces groupements, la distance entre deux particules voisines est variable. Le nombre le plus fréquent de particules reliées entre elles dans ce type d'arrangements est de 3 à 4. A un grossissement plus important (250 000), ces particules élémentaires apparaissent de forme variable ou irrégulière et de structure condensée, fortement repliée sur elle-même. Bien qu'il soit possible dans certains cas de déceler des sortes de sous-unités, on ne peut clairement mettre en évidence, à l'intérieur de la particule, des sous-structures régulières (planche 2).

Les fractions "90S, Mg^{++} " et "110S, Mg^{++} " ont été étudiées dans les mêmes conditions : les particules élémentaires qui peuvent y être identifiées ne présentent pas de caractéristiques ultrastructurales sensiblement différentes de celles de la fraction "80S, Mg^{++} ". Les arrangements "en chapelets" de plusieurs particules sont également présents dans ces fractions.

b) En l'absence d'ion Mg^{++} (et présence d'EDTA).

Dans les deux fractions étudiées, 80 et 55S, l'image correspond toujours à une coloration négative, les arrangements entre particules élémentaires ne sont plus présents.

Les particules isolées dans la fraction "55S, EDTA" ont des dimensions légèrement inférieures à celles de la fraction "70S, Mg^{++} " : 205 x 190 Å. Leur forme est irrégulière et leur structure apparaît décondensée et constituée de plusieurs éléments subparticulaires (planche 3).

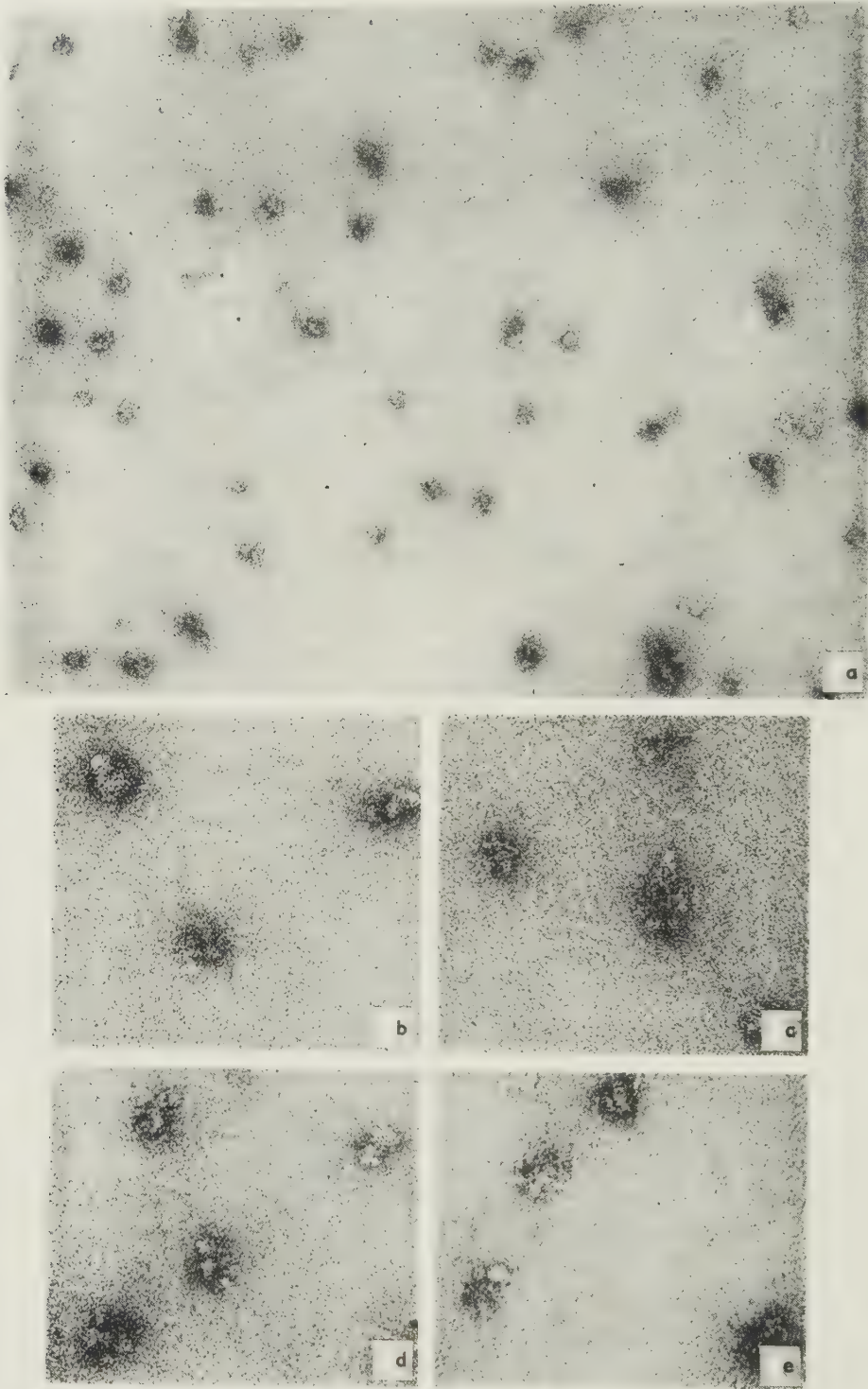


PLANCHE 3 : RNP's nucléolaires de 55S (en présence d'EDTA).

Les fractions obtenues après ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose, en présence d'EDTA, des éléments extraits du nucléole par traitement par l'héparine sont colorées par l'acétate d'uranyle. Les particules apparaissent en coloration négative (a, x 120 000) et sont constituées de petits éléments subparticulaires (b, e, x 250 000).

Discussion :

Il est difficile d'identifier dans les différentes fractions de RNPs nucléolaires isolées sédimentant à plus de 50S plusieurs classes de particules nettement définies du point de vue morphologique.

- On peut reconnaître, en première approximation, la présence générale d'un type unique de particule, dont les dimensions sont très proches de celles des éléments de type granulaire, détectables in situ dans le nucléole.

Les éléments de type fibrillaire au niveau desquels se localise in situ l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé ne sont pas reconnaissables dans les fractions étudiées.

Nous avons constaté que, dans nos conditions d'isolement des RNPs nucléolaires, l'ARN nouvellement synthétisé se retrouve presque exclusivement au niveau d'éléments à faible vitesse de sédimentation (20 - 50S) avant d'apparaître dans les RNPs sédimentant plus rapidement (80S-EDTA). L'étude biochimique de ces éléments est exposée dans le chapitre suivant.

La présence d'arrangements linéaires de plusieurs particules dans les fractions isolées et étudiées en présence d'ion Mg^{++} est particulièrement remarquable.

On ne peut complètement exclure que ces images aient une origine purement artificielle (trainées de colorants en particulier). Cependant, elles n'apparaissent ni pour les ribosomes cytoplasmiques (monomères) observés dans les mêmes conditions (présence d'ion Mg^{++}), ni quand les RNPs nucléolaires sont isolées en présence d'EDTA. Par ailleurs, l'étude biochimique de ces RNPs (voir plus haut) suggère fortement la présence, dans les fractions isolées en présence d'ion Mg^{++} , l'association de plusieurs types d'éléments distincts : la sédimentation, en présence d'EDTA, de chacune des fractions isolées en présence d'ion Mg^{++} , provoque l'apparition de plusieurs espèces RNPs différentes. L'analyse en densité de flottation et celle de l'ARN extrait de ces fractions RNPs (en présence d'ion Mg^{++}) confirment leur hétérogénéité, du point de vue biochimique.

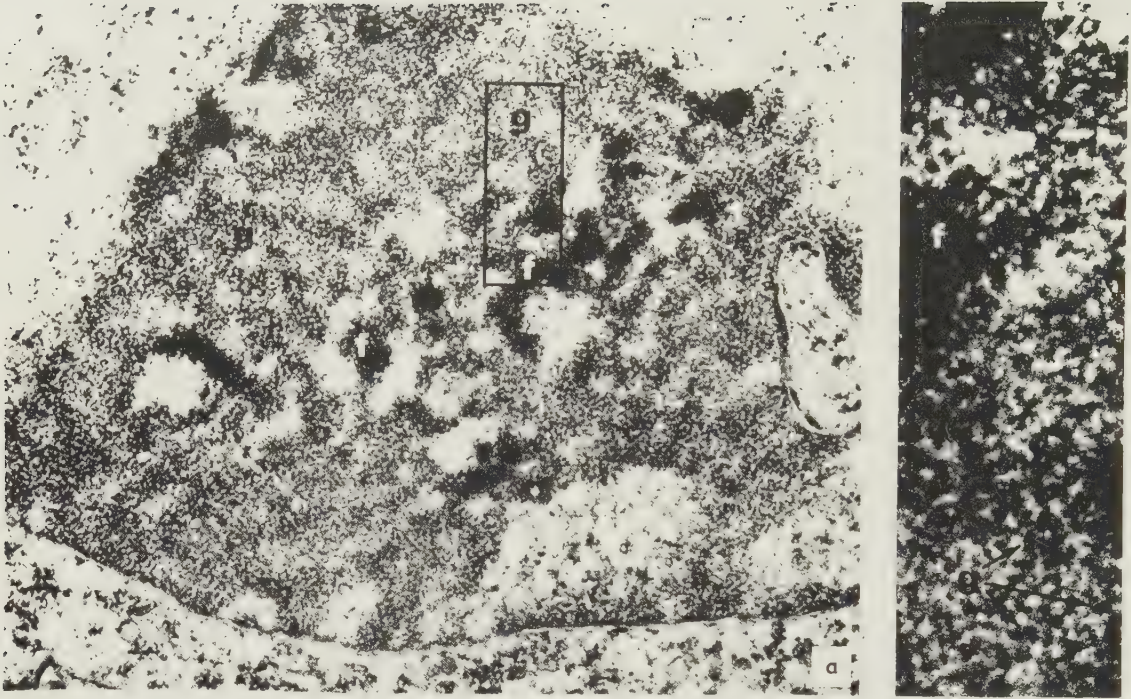


PLANCHE 4 : Nucléole observé in situ.

a. (x 25 000). La masse nucléolaire est constituée par des granules (g) largement dispersés dans un réseau fibrillaire (F) de forte densité électronique. Dans la région encadrée, on peut distinguer des granules dont le diamètre varie entre 150 et 200 Å.

b. Encadré de a, x 100 000.

La fixation est effectuée par l'acide osmique, l'enrobage est obtenu par l'Epon.

Ce travail a été réalisé par SIMARD et al. (1969) sur les cellules d'hépatome de rat.

On peut donc penser que les associations interparticulaires décelées à l'examen ultrastructural préexistent dans les fractions de RNPs nucléolaires isolées en présence d'ion Mg^{++}

In situ, les granules nucléolaires semblent faire partie d'une structure continue dont ils ne peuvent être libérés in vivo qu'aux stades ultimes de leur maturation intranucléolaire.

Il est possible que, dans ces conditions d'isolement, l'organisation supraparticulaire des éléments granulaires qui existe in situ (voir planche 4) ne soit pas extensivement dissociée. Cependant, il reste difficile actuellement d'approfondir la nature et le rôle de telles associations de particules qui seraient partiellement préservées après leur isolement du nucléole.

CONCLUSION DU CHAPITRE.

L'ARN préribosomique présent dans le nucléole a pu être isolé sous forme de complexes RNPs. En l'absence d'ion Mg^{++} , deux formes RNPs majeures, de 80 et 55S, et une espèce mineure (65S) ont été séparées. Les espèces de 80 et 55S diffèrent par leur contenu en ARN (respectivement 45 et 32S) et par la nature et les proportions des protéines liées. Une proportion importante des protéines des RNPs nucléolaires est de type ribosomique.

Ces résultats sont en accord avec ceux de WARNER et SOEIRO (1967) et de KUMAR et WARNER (1972) obtenus sur un matériel cellulaire (cellules HeLa) et par un procédé d'isolement différent. Les vitesses de sédimentation et les caractéristiques ultrastructurales des RNPs nucléolaires isolées dépendent étroitement de la présence ou de l'absence de l'ion Mg^{++} .

En présence d'ion Mg^{++} , des associations interparticulaires ont été mises en évidence. Elles peuvent correspondre à la préservation partielle d'arrangements de particules préexistant in situ.

Dans les différentes fractions étudiées (vitesses de sédimentation $> 50S$), seules des particules de type granulaire ont pu être détectées. Leurs dimensions globales sont voisines de celles des ribosomes cytoplasmiques. Les RNPs de type fibrillaire, au niveau desquels se localise in situ l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé, ne sont pas identifiables dans ces fractions.

En vue de préciser certains aspects de l'organisation des zones de chromatine activement transcrite, il importait plus particulièrement de caractériser les phases post-transcriptionnelles précoces, au niveau de l'appareil nucléolaire.

Les résultats de cette étude sont exposés dans le chapitre suivant.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE 3

ETUDE DES PHASES PRECOCES

DE L'ELABORATION DES PRERIBOSOMES NUCLEOLAIRES

L'étude de l'organisation mutuelle de régions chromatinienne-
 activement transcrites et des éléments contenant l'ARN nouvellement synthé-
 tisé a été engagée sur le système-modèle que constitue le nucléole pour
 tenter de préciser les relations entre un arrangement ultrastructural
 défini et la complétion d'étapes post-transcriptionnelles de maturation
 de l'ARN, en particulier des étapes précoces. En effet, les phases précoces
 de l'élaboration des préribosomes peuvent concerner un ARN encore lié à
 l'ADN matrice ou maintenu dans l'environnement immédiat de la chromatine
 active.

INTRODUCTION

Les produits précoces des gènes ribosomiques ont été étudiés à
 l'aide de la technique d'isolement qui a été définie dans le précédent
 chapitre. Nous avons pu mettre en évidence un type de RNP nucléolaire,
 non encore décrit, à durée de vie courte et qui contient l'ARN 45 S
 nouvellement synthétisé. Ce type de RNP présente des caractéristiques
 de précurseur des RNPs de 80 S. Son identification peut permettre de
 préciser certains aspects des processus post-transcriptionnels précoces.

I. MISE EN EVIDENCE D'ELEMENTS, CONTENANT L'ARN NUCLEOLAIRE PRECOCE, DISTINCTS DES RNPs DE 80 S

Nous avons étudié, sur des intervalles courts, la cinétique de marquage en ARN des éléments extraits des nucléoles isolés par le traitement par l'héparine.

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées pendant 3, 6 ou 30 minutes par addition d'uridine (^3H). Le premier temps de marquage (3 minutes) a été choisi de façon à permettre un marquage préférentiel des molécules d'ARN de 45 S qui viennent d'être synthétisées (voir discussion p.78). Ce temps est très proche du temps de synthèse d'une chaîne complète d'ARN 45 S, qui a pu être déterminé par d'autres auteurs (GREENBERG et PENMAN-1966). Les nucléoles sont isolés et les éléments nucléolaires extraits sont analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose dans les conditions utilisées précédemment (voir paragraphes précédents), en présence d'ion Mg^{2+} (fig.1).

Les éléments contenant l'ARN nouvellement synthétisé (après 3 minutes de marquage) sont alors retrouvés en majeure partie dans des fractions correspondant à des vitesses de sédimentation relativement basses (20 à 50 S). Pour les temps de marquage supérieurs, la part de radioactivité retrouvée au niveau d'éléments sédimentant à plus de 50 S augmente progressivement et, pour une incorporation d'uridine (^3H) de 30 minutes, la majeure partie de la radioactivité se localise dans la zone 80-55 S.

Si la séparation de l'extrait nucléolaire sur gradient de densité de saccharose est réalisée en l'absence d'ion Mg^{2+} (et présence d'EDTA), la même évolution peut être observée, de façon encore plus nette (fig.2)

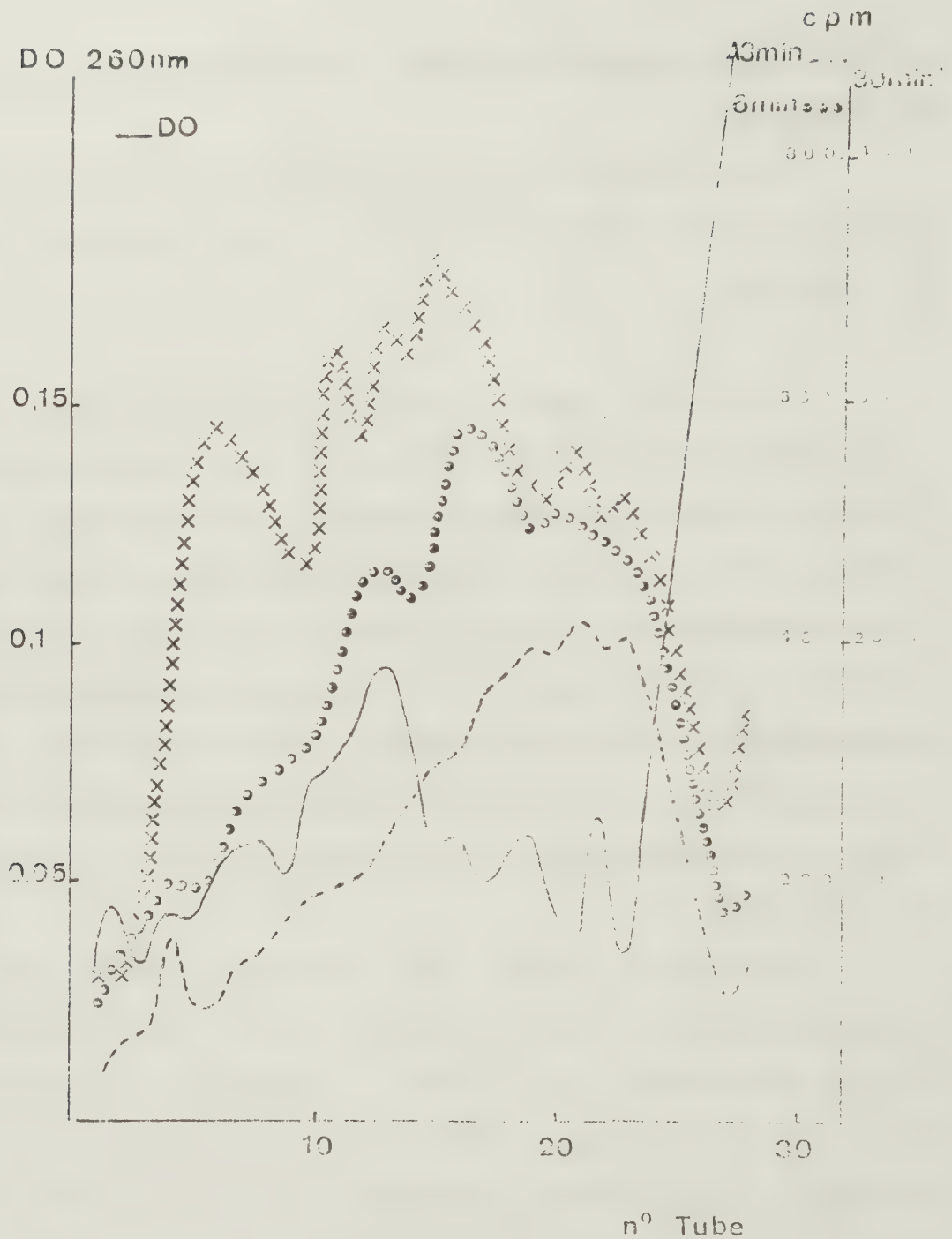


Fig. I : SEPARATION DES RNPs NUCLEOLAIRES EN PRESENCE DE Mg^{2+}

Les éléments nucléolaires extraits par l'héparine sont analysés sur un gradient de saccharose (15-30%) dans le tampon TMK. Les cellules d'hépatome ont été marquées par l'uridine (3H) pendant :

3 mn (— — — — —) ; 6 mn (●●●●●●) ; 30 mn (××××××).

2 heures de centrifugation à 42000 t/mn (rotor SW 50).

du fait sans doute de la dispersion réduite observée quand les éléments nucléolaires sont séparés en l'absence de Mg^{2+} .

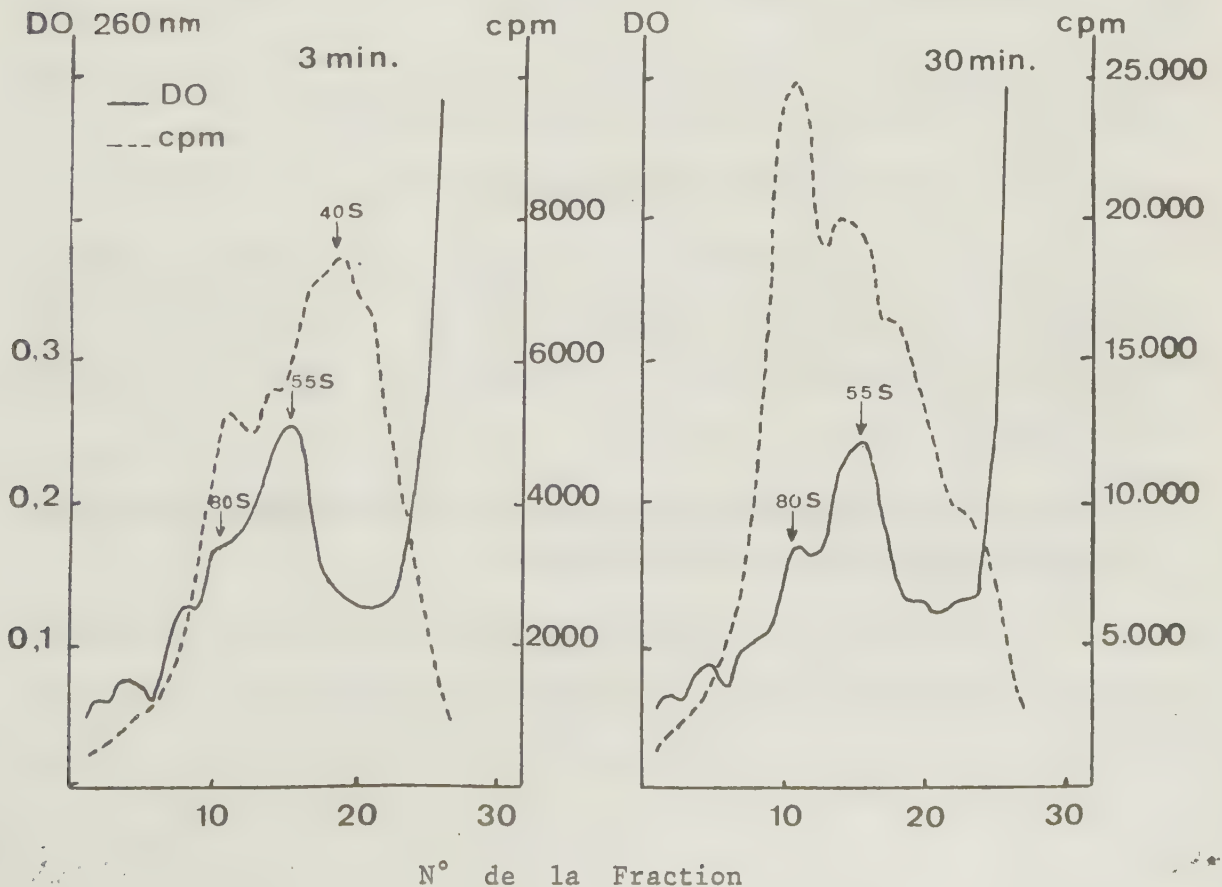
L'analyse de l'ARN nucléolaire effectuée parallèlement sur des parties aliquotes des nucléoles isolés montre (fig. 3c) qu'après 3 minutes d'incorporation d'uridine (3H), 50 % environ de la radioactivité se retrouve au niveau de l'espèce 45 S.

Fig. 2 : SEPARATION DES RNPs NUCLEOLAIRES EN L'ABSENCE DE Mg^{2+} .

Les éléments nucléolaires extraits par l'héparine sont analysés sur un gradient de saccharose (15-30%) dans le tampon NEB.

a) 3 mn de marquage par l'uridine (3H) . b) 30 mn de marquage.

2 heures de centrifugation à 42000 t/mn (rotor SW 50).



Discussion

Ce déplacement progressif du marquage des fractions à vitesse de sédimentation 20 à 50 S vers des fractions sédimentant plus rapidement (80-55 S) pouvait apparaître contradictoire avec les résultats d'autres auteurs (WARNER-1967 et LIAU et PERRY-1969) qui avaient observé que la maturation de l'ARN nucléolaire pérribosomique correspondait à une transition de particules "lourdes" vers des particules sédimentant moins rapidement (respectivement RNPs de 80 et 55 S, en l'absence d'ion Mg^{2+}).

En fait, le marquage précoce, observé dans la zone 20-50 S, n'intéresse pas les éléments dits "55 S". De plus, nous avons pu nous-mêmes observer, pour des temps de marquage supérieurs (30 minutes et 1 heure), un déplacement relatif de la radioactivité de la zone 80 S vers la zone 55 S, correspondant à la transition $45 S \rightarrow 32 S$ intéressant l'ARN nucléolaire pérribosomique.

En définitive, il semble que le marquage précoce des fractions 20-50 S n'a pu être remarqué par les auteurs pré-cités du fait de cinétiques insuffisamment courtes : le temps de marquage minimum étudié par LIAU et al. (1969) est de 15 minutes ; au bout de ce temps, le déplacement relatif du marquage que nous avons observé est déjà intervenu pour l'essentiel et le marquage des fractions 20-50 S devient difficilement détectable, en raison de sa proportion faible. Il convient de remarquer que les méthodes d'extraction utilisées par ces auteurs ne permettent qu'une libération partielle de l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé et paraissent donc peu favorables à une étude des événements très précoces concernant l'ARN nucléolaire.

La localisation distincte de 2 types d'éléments contenant tous deux de l'ARN 45 S (éléments 20-50 S et éléments 80 S) pouvait s'interpréter soit :

- par l'existence in situ de 2 pools parallèles d'ARN 45 S (pools à taux de renouvellement différents), sans qu'il y ait transfert d'ARN entre les deux classes ;
- soit à l'existence d'une relation précurseur-à-produit entre les éléments de la zone 20-50 S et les RNPs de 80 S.

Nous avons entrepris de caractériser ces éléments dont l'ARN est précocement marqué en vue de préciser leur rôle dans le fonctionnement nucléolaire et éventuellement dans la maturation ribosomique. Les divers résultats qui ont pu être obtenus indiquent qu'ils peuvent constituer un stade primaire dans l'élaboration des pérribosomes, antérieur à la formation des RNPs de 80 S.

2. DEFINITION DES CONDITIONS OPTIMA POUR L'ETUDE DES ELEMENTS CONTENANT L'ARN NUCLEOLAIRE NOUVELLEMENT SYNTHETISE .

L'étude de l'ARN nouvellement synthétisé implique l'utilisation de temps de marquage très courts. Cependant, quand on réduit le temps de marquage, divers inconvénients apparaissent qui peuvent limiter l'interpré-

tation des résultats. Tout d'abord, l'équilibration des pools intracellulaires de précurseurs avec le produit marqué n'est pas immédiate. De plus, plus ce temps est court et plus la proportion de radioactivité incorporée dans des chaînes non terminées à la fin du marquage devient importante.

Pour définir les temps de marquage optimum pour l'étude entreprise, nous avons déterminé comment variait, en fonction de la durée de marquage, la part de radioactivité incorporée qui se retrouvait effectivement intégrée dans des molécules terminées.

Avec les hypothèses qui seront précisées plus bas, on peut démontrer que ce pourcentage est égal à 50 % pour un temps de marquage égal à la durée de synthèse d'une chaîne complète d'ARN.

Pour les cellules d'hépatome ascitique du rat, nous avons constaté qu'au bout de 3 minutes de marquage par l'uridine (^3H), plus de 50 % de la radioactivité incorporée au niveau du nucléole était sous forme de molécules d'ARN 45 S. Cela signifie que le temps de 3 minutes est suffisant pour la synthèse d'une chaîne complète d'ARN 45 S. GREENBERG et PENMAN (1966), par des cinétiques de méthylation de l'ARN extrait de nucléoles de cellules HeLa, avaient obtenu une valeur de 2,3 minutes comme limite inférieure de la durée de synthèse de la molécule de 45 S.

En conclusion, le temps de marquage de 3 minutes, proche de la durée de synthèse de cette molécule, permet d'obtenir des conditions d'étude favorables : une proportion élevée du marquage est intégrée dans des chaînes complètes dont "l'âge" moyen est très bas.

Calcul du pourcentage de radioactivité incorporée dans des molécules terminées en fonction de la durée du marquage

Les hypothèses suivantes ont été faites :

- La population cellulaire reste dans des conditions de croissance régulière tout au long de l'expérience.
- Le délai entre l'addition du précurseur radioactif dans la suspension cellulaire et l'équilibrage des pools intranucléolaires est assez court pour être négligé.
- Les seuls ARNs nucléolaires marqués de façon significative pour la période considérée sont de type préribosomique.
- La durée de vie moyenne d'une molécule d'ARN 45 S est suffisamment longue, par comparaison aux temps considérés, pour qu'on puisse négliger, dans la phase initiale, la part d'ARN 45 S marqué qui est transformé in vivo par le processus de maturation.

Soit : λ le nombre de nucléotides d'une molécule terminée,
 v le taux de synthèse (en nucléotides intégrés par unité de temps)
 t le temps de marquage
 θ la durée de synthèse d'une chaîne complète.

Quand $t < \theta$, les relations suivantes peuvent être établies :

- 1) L_t (longueur marquée maximum d'une chaîne complète) = $\lambda \times \frac{t}{\theta}$
 cela correspond aux chaînes qui se terminent exactement à la fin du marquage.
- 2) Soit $\bar{L}_t$ la longueur moyenne marquée dans les chaînes complètes :

$$\bar{L}_t = \frac{1}{2} L_t = \frac{1}{2} \times \lambda \times \frac{t}{\theta}$$

3) Sur l'intervalle $(0, t)$, le nombre de chaînes complètes synthétisées

$$\text{est } N_t = \frac{\nu}{\lambda} \times t$$

4) Le nombre de nucléotides marqués incorporés dans des chaînes complètes

$$\text{est : } n = N_t \times \overline{L}_t = \frac{1}{2} \nu \times \frac{t^2}{\theta}$$

5) Le nombre total de nucléotides marqués incorporés : $n_t = \nu \times t$

D'où la part de radioactivité incorporée dans des molécules complètes est

$$F = \frac{n}{n_t} = \frac{1}{2} \times \frac{t}{\theta}$$

$$F = \frac{1}{2} \cdot \frac{t}{\theta}$$

Si $t > \theta$, l'ensemble de marquage incorporé pendant l'intervalle $(0, t - \theta)$ est retrouvé dans des chaînes terminées à la fin du marquage.

Pour l'intervalle $(t - \theta, t)$, on est ramené au cas précédent et on montre que

$$F = 1 - \frac{\theta}{2t}$$

Les variations de F sont représentées sur la figure. Il apparaît bien que des temps de marquage de l'ordre de la durée de synthèse sont optimum pour l'étude envisagée. Ainsi, pour un temps moitié ($t = \frac{1}{2} \theta$), seulement 25 % du marquage est intégré dans des chaînes complètes.

3. ETUDE COMPAREE D'UN AUTRE SYSTEME D'ISOLEMENT DES RNPs NUCLEOLAIRES.

Nous avons envisagé la possibilité que la localisation distincte, après analyse sur gradient de densité de saccharose, des éléments contenant l'ARN nucléolaire rapidement marqué pouvait résulter de changements structuraux artificiels, prenant place au cours de l'extraction des préribosomes et concernant une fraction des RNPs de type 80 S. Dans cette hypothèse,

cependant, cet effet artificiel serait fonction du degré de maturation puisqu'il permettrait de distinguer et de séparer de l'ensemble de la population de RNPs de 80 S, les éléments les moins maturés, dont la structure serait la plus sensible. On pouvait penser, par exemple, que l'héparine, utilisée pour obtenir la dissociation de la chromatine nucléolaire, du fait de son affinité pour les protéines basiques, pouvait induire une déprotéinisation plus ou moins poussée des préribosomes précoces ayant pour conséquence une réduction de leur vitesse de sédimentation.

Cependant, l'expérience de contrôle décrite dans un paragraphe précédent ne semblait pas conforter cette hypothèse : des ribosomes cytoplasmiques, utilisés comme témoins, et traités dans les conditions d'extraction des préribosomes, ne subissent pas de modification sensible de leur spectre protéique (voir précédemment p. 45).

Cependant, comme il n'était pas possible d'envisager un contrôle direct sur des préribosomes précoces "natifs", un effet sélectif vis-à-vis de structures relativement instables ne pouvait être exclus.

En vue de déceler d'éventuels artefacts liés au procédé d'isolement lui-même, l'étude cinétique précédente a été reprise en mettant en oeuvre une technique d'extraction différente, celle décrite précédemment par WARNER et al. (1967). La dissociation partielle des structures nucléolaires est alors obtenue non par un polyanion mais en utilisant un agent réducteur, le dithiothéitol, permettant de rompre les liaisons disulfures. Dans ces conditions encore, les éléments contenant l'ARN précoce nouvellement marqués ont des vitesses de sédimentation nettement inférieures à 80 S : ils sont encore retrouvés dans la zone 20-50 S. Cette localisation distincte entre ces éléments et les RNPs de 80 S ne peut donc résulter d'un simple effet de l'héparine au cours de la lyse nucléolaire.

Mode opératoire :

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique marqués pendant 3 ou 30 minutes par l'uridine (^3H). Les nucléoles purifiés sont remis en suspension dans 1,5 ml de milieu NEB (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) contenant du dithiothréitol (10 mM). La suspension est homogénéisée par pipettages fréquents puis maintenue 15 minutes à 0°C avant d'être soumise pendant 10 secondes à l'effet d'oscillations soniques (appareil Raythéon DF 101). Le lysat nucléolaire est alors centrifugé pendant 10 minutes à 25 000 g. L'extrait nucléolaire (surnageant 25 000 g) est ensuite analysé sur gradient de densité de saccharose (15-30 %) dans le milieu NEB, après 2 heures de centrifugation à 42 000 t/mn (rotor Spinco SW 50), comme décrit précédemment.

Deux modifications ont été apportées par rapport à la technique primitive décrite par WARNER (1967) :

1°) l'utilisation d'une température plus basse lors de l'extraction (0-4°C au lieu de 25°C) qui, si elle conduit à l'obtention de taux d'extraction légèrement inférieurs, permet de réduire notablement la dégradation in vitro de l'ARN nucléolaire observé sur notre matériel.

2°) L'emploi d'oscillations soniques qui améliore fortement la sortie d'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé. Nous avons vérifié (voir plus loin p. 16) que ce traitement ne modifie pas de façon décelable la longueur des molécules d'ARN nucléolaire.

Les résultats de l'étude comparative des 2 procédés d'extraction, celui utilisant l'héparine et celui dérivé de la technique de Warner, sont décrits fig. 3. La presque totalité de la radioactivité extraite des nucléoles par les deux procédés se retrouve dans des éléments sédimentant entre 20 et 50 S, après 3 minutes de marquage.

Après 30 minutes d'incorporation, temps au bout duquel l'ARN nucléolaire marqué est essentiellement sans forme de 45 S, c'est au niveau des éléments de type 80 S que se retrouve principalement le marquage, dans les deux techniques utilisées.

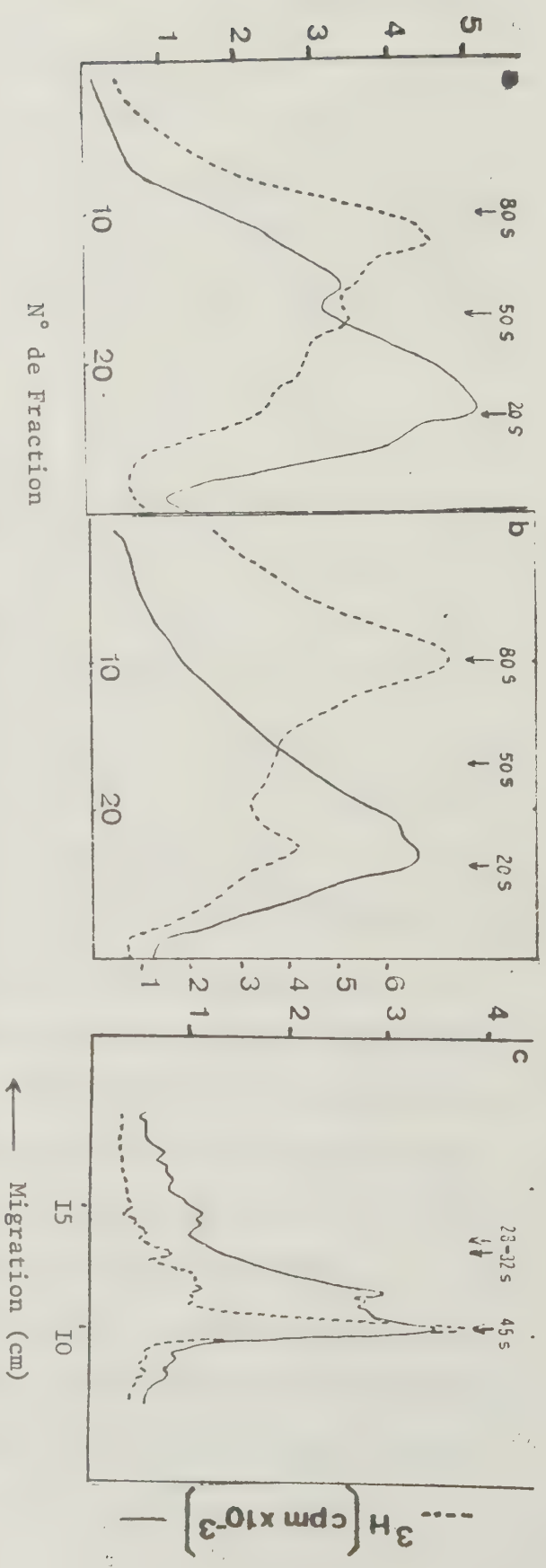


Fig. 3 : CINETIQUE DU MARQUAGE EN ARN DES ELEMENTS SUBNUCLEOLAIRES.

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées in vitro par incorporation d'uridine (^3H) pendant 3 ou 30 minutes.

Les RNPs nucléolaires sont extraits soit par traitement des nucléoles isolés par l'héparine (a), soit par la méthode de WARNER(1967) (b), puis analysés par ultracentrifugation sur un gradient de saccharose(15-30%) dans le tampon NEB(NaCl 10mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 10mM pH 7,4), 2heures à 42000t/mn (rotor Spinco SW50).

c) Profil de radioactivité de l'ARN nucléolaire, extrait d'une partie aliquote des nucléoles isolés. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose.

----- : 3 minutes . _____ : 30 minutes.

L'évolution observée concernant l'ARN nouvellement synthétisé n'est pas spécifique du matériel cellulaire étudié. La même étude cinétique réalisée sur des cellules humaines (HeLa) et des cellules de hamster (CHO) a conduit à des résultats analogues.

4. DEGRADATION IN VITRO DE L'ARN NUCLEOLAIRE AU COURS DE LA LYSE DES NUCLEOLES .

En vue de contrôler l'intégrité des chaînes d'ARN nucléolaire au terme des processus d'isolement des préribosomes, nous avons analysé, aux divers stades du fractionnement cellulaire, l'ARN retrouvé dans les diverses sous-fractions cellulaires. Nous avons pu constater que jusqu'au stade des nucléoles isolés, il n'y a pas de dégradation décelable de l'ARN nucléolaire. Par contre, la lyse ultérieure des nucléoles isolés même quand elle est effectuée à basse température (0-4°C), peut entraîner une dégradation plus ou moins importante de l'ARN nucléolaire.

Ce phénomène artificiel peut perturber l'interprétation des résultats de l'étude des préribosomes. Il importe d'en apprécier l'importance et, éventuellement, de le réduire autant que possible.

Une mesure quantitative a été effectuée de la manière suivante : Des nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique marquées pendant des temps variables par incorporation d'uridine (^3H). L'extraction des préribosomes est ensuite effectuée dans des conditions standard (concentration des nucléoles, volume de la suspension nucléolaire, durée de la lyse), selon les deux procédés précédemment décrits. L'ARN total est alors extrait du lysat nucléolaire puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose et comparé à l'ARN nucléolaire total extrait d'une partie aliquote des nucléoles isolés, prélevée avant la lyse. Les résultats

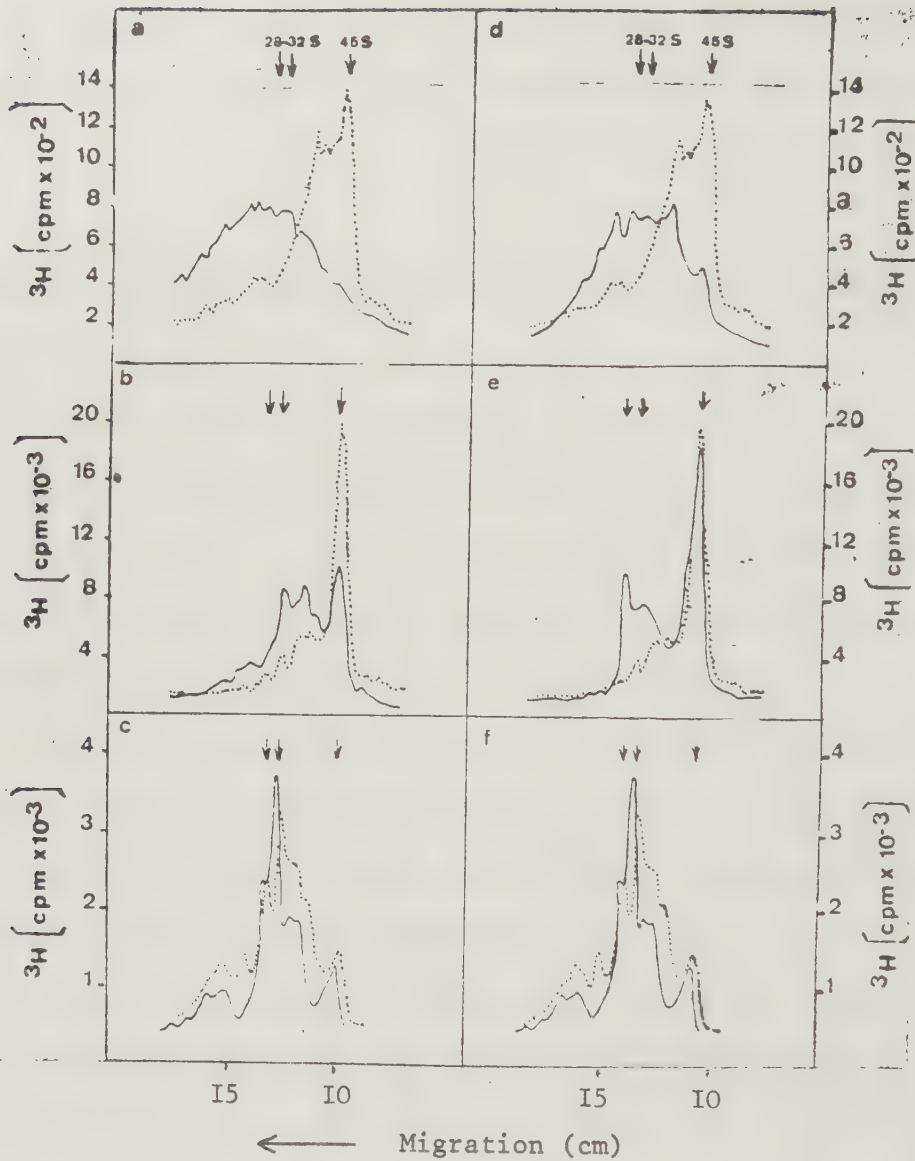


Fig. 4 : HYDROLYSE IN VITRO DE L'ARN NUCLEOLAIRE LORS DE LA LYSE NUCLEOLAIRE

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées par l'uridine (^3H) pendant 3 minutes (a,d) , 30 minutes (b,e) ou 4 heures (c,f). Les nucléoles sont lysés soit par le traitement par l'héparine (a,b,c) soit selon la technique de WARNER (1967) (d,e,f). L'ARN est extrait du lysat nucléolaire total (—), ainsi que d'une partie aliquote des nucléoles isolés et non traités (.....). L'analyse de l'ARN est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose.

obtenus sont décrits fig. 4 , après extraction par traitement à l'héparine (4 a, b, c) ou d'après la méthode de WARNER (4 d, e, f).

Il apparaît globalement que, dans les deux cas, la dégradation *in vitro* est d'autant plus importante que l'ARN nucléolaire est synthétisé depuis moins longtemps. Plus précisément, d'après les profils de marquage obtenus fig. 4 , il est possible de mesurer la proportion d'ARN de 45 S qui a été transformé en molécules plus courtes au cours de la lyse nucléolaire. Les résultats sont décrits fig. 5 . Il est clair que, dans les deux cas, l'ARN 45 S est d'autant plus sensible qu'il est synthétisé depuis moins longtemps. Cependant, quand l'extraction est réalisée par action du DTT en présence d'EDTA, le taux de dégradation reste inférieur à celui qu'on observe lors d'une lyse par l'héparine en présence de Mg^{2+} . De plus, dans le premier cas, la longueur des chaînes d'ARN produites par la dégradation de l'ARN rapidement marqué (3 minutes) est voisine de celle des intermédiaires naturels de la maturation préribosomique (profil de la fig. 4d), tandis qu'après extraction par l'héparine en présence de Mg^{2+} , les ARNs produits *in vitro* sont nettement plus courts et leur distribution en taille est polydispersée (fig. 4 a).

Discussion

Par des expériences d'incubation in vitro de nucléoles isolés de cellules L, LIAU et al. (1968) et KELLEY et PERRY (1971) avaient pu montrer la présence de deux types d'enzymes nucléolytiques dans les nucléoles isolés :

- une activité endonucléasique (caractérisée par la longueur des ARNs produits) peut être observée même en l'absence de Mg^{2+} ; elle est inhibée par l'addition, en concentration relativement élevée, d'ARN ribosomique exogène de 18 et 28 S.

- une activité exonucléasique, décelable uniquement en présence d'ion Mg^{2+} .

Le processus de dégradation in vitro de l'ARN 45 S nucléolaire précoce que nous observons au cours de l'extraction des préribosomes semble pouvoir être attribué à ces deux types d'enzymes, d'après les différences en taux de dégradation (fig. 5) et en taille des ARNs formés selon que l'ion Mg^{2+} est présent ou non.

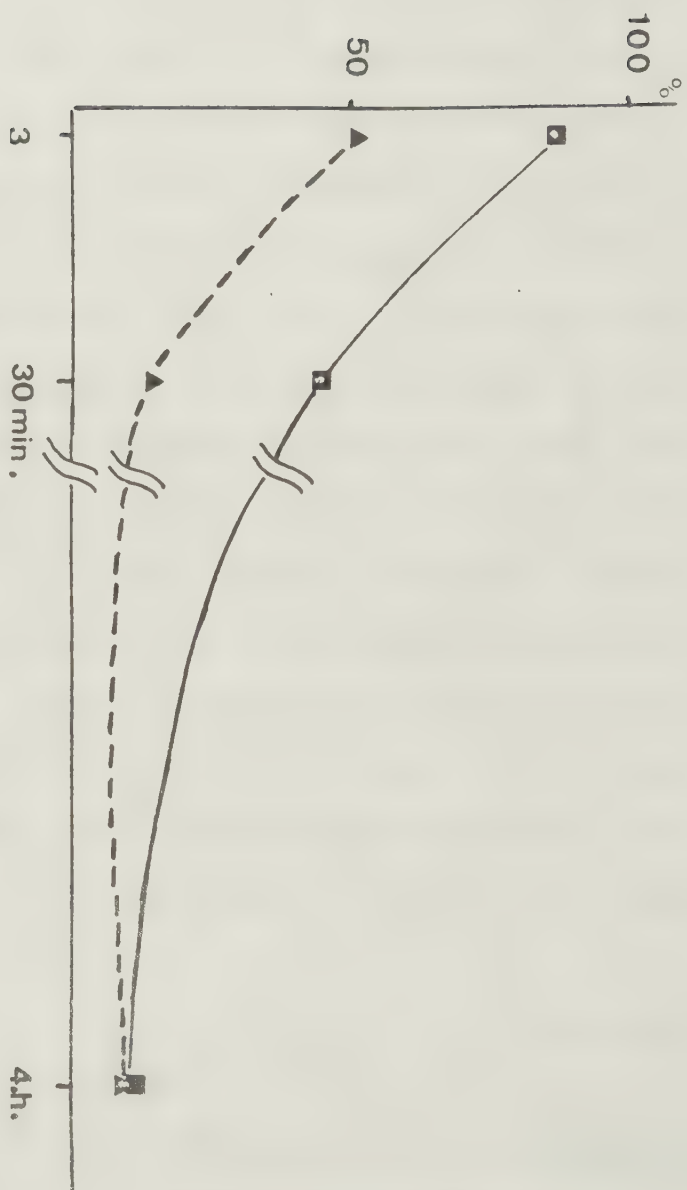


Fig. 5 : TAUX D'ARN 45 S HYDROLYSÉ IN VITRO

Les valeurs sont déterminées d'après les courbes de la fig. 4, pour les divers temps de marquage et pour les deux techniques d'isolement des RNPs nucleolaires étudiées, celle décrite par WARNER (1967), (— — — —) ou par BACHELLERIE (1971), (— — — —).

Nous avons vérifié que ces coupures des chaînes d'ARN nucléolaire ne sont pas dues à des contaminations de RNAase dans les produits utilisés, ni à un effet direct des conditions physico-chimiques utilisées, en particulier de la sonication, pour obtenir l'extraction des préribosomes.

Quand de l'ARN marqué de 45 S est extrait de nucléoles isolés puis soumis aux conditions de lyse nucléolaire (mais en l'absence de nucléole) avant d'être analysé par électrophorese sur gel de polyacrylamide-agarose, nous n'avons pu déceler aucune coupure de la chaîne d'ARN 45 S marqué, quelle que soit la durée de son marquage *in vitro*.

Il semble donc bien que la dégradation *in vitro* qui vient d'être décrite soit due à l'action d'éléments liés aux structures nucléolaires isolées.

5. ANALYSE DES ELEMENTS NUCLEOLAIRES PRECOCES EN L'ABSENCE DE DEGRADATION IN VITRO

Les résultats précédents mettent en évidence une action d'enzymes nucléolytiques variable selon l'âge du RNA 45 S. Les éléments subnucléolaires qui contiennent le RNA 45 S ne constituent donc pas un pool unique d'éléments identiques mais peuvent se trouver successivement dans des états différents.

Cependant, les caractéristiques des éléments précoces ainsi mis en évidence, et en particulier leur vitesse de sédimentation et leur contenu en protéines, pouvaient avoir été notablement modifiées par le processing *in vitro*. Ainsi, on ne pouvait déterminer si des éléments précoces, à faible vitesse de sédimentation (20-50 S), préexistent *in situ* ou bien s'ils résultent de la transformation *in vitro* de RNPs sédimentant plus rapidement, pouvant avoir des caractéristiques voisines de celles des préribosomes de 80 S plus maturés.

Il faut remarquer néanmoins que l'extraction des préribosomes par le DTT en l'absence de Mg^{2+} , pour laquelle le processing *in vitro* est réduit, conduit à un profil identique du marquage précoce après analyse par ultracentrifugation (fig.3 a et b).

En vue d'une caractérisation plus poussée des éléments contenant l'ARN nucléolaire précoce, nous avons entrepris de modifier les conditions d'isolement de manière à réduire au maximum le taux de dégradation *in vitro* de l'ARN précoce nucléolaire.

a) Utilisation d'ion Mn^{2+}

La présence d'ion Mn^{2+} (10 mM) en remplacement d'ion Mg^{2+} au cours de l'extraction par traitement à l'héparine permet de supprimer à peu

près complètement la dégradation de l'ARN précoce (fig. 6). MIRAULT et SCHERRER (1972) ont montré que ce cation inhibe une endonucléase nucléaire isolée de cellules HeLa. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la présence d'ion Mn^{2+} réduit considérablement le taux de sortie de l'ARN précoce (qui n'est plus que de 5 % au lieu de 95 %) et empêche donc une étude ultérieure dans des conditions convenables.

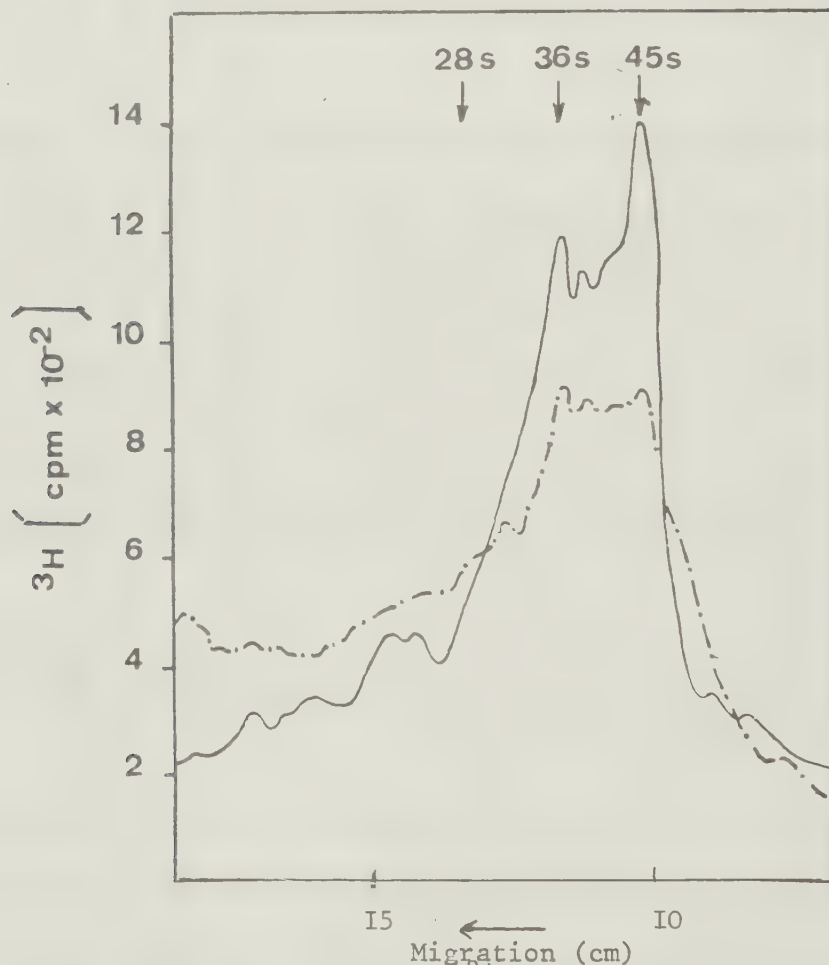


Fig. 6 : EFFET INHIBITEUR DE L'ION Mn^{2+} SUR L'HYDROLYSE IN VITRO DE L'ARN 45 S.

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées pendant 3 minutes par l'uridine (3H) et les nucléoles sont isolés selon la méthode de ZALTA, par sonication à basse force ionique. La lyse des nucléoles par l'héparine est effectuée en présence d'ion Mn^{2+} (10 mM). L'ARN du lysat nucléolaire est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose (— — —). L'ARN nucléolaire extrait, avant la lyse des nucléoles, d'une partie aliquote est également analysé (——) .

Il est possible que, dans nos conditions, l'inhibition de toute dégradation *in vitro* ne soit qu'un effet indirect de l'ion Mn^{2+} , dont la présence réduit considérablement l'effet lytique du traitement d'extraction sur les structures nucléolaires. Dans ces conditions, donc, les nucléases nucléolaires et les éléments contenant l'ARN précoce pourraient être maintenus dans des sites nucléolaires distincts.

b) Utilisation de haute force ionique

L'utilisation de milieux à haute force ionique s'est révélée efficace pour supprimer la dégradation *in vitro* de l'ARN nucléolaire précoce (leur emploi a cependant introduit d'autres difficultés qui sont exposées plus bas). Dans ces conditions, les éléments contenant l'ARN 45 S nucléolaire nouvellement synthétisé se distinguent des RNPs de 80 S contenant l'ARN 45 S plus "âgé" par des vitesses de sédimentation nettement inférieures (20-50 S).

LIAU et PERRY (1969) avaient constaté, lors d'incubations de nucléoles isolés, que la transformation subie in vitro par l'ARN de 45 S était très nettement réduite si les nucléoles étaient isolés à force ionique élevée. Dans une étude des conditions qui pourraient permettre à des nucléoles isolés incubés in vitro, de convertir l'ARN 45 S en ARN ribosomiques 18 et 28 S ou en autres intermédiaires naturels, ces auteurs avaient observé que l'ARN 45 S de nucléoles isolés à haute force ionique, selon la méthode de PENMAN et al (1966), était nettement plus stable que celui de nucléoles isolés à basse force ionique. Cette protection de l'ARN 45 S semblait résulter de l'utilisation d'un milieu à haute force ionique "HFI" (0,5 M en NaCl, 50 mM en $MgCl_2$) pour l'isolement des nucléoles : pour des nucléoles isolés à basse force ionique, un lavage par HFI réduisait considérablement l'activité des nucléases vis-à-vis du 45 S, durant l'incubation des nucléoles.

Dans nos conditions, un lavage par le milieu HFI des nucléoles isolés effectué avant l'extraction des préribosomes nous a effectivement permis de supprimer tout processing du RNA précoce pendant la lyse nucléo-

laire (résultats non publiés). Ces éléments extraits alors du nucléole et analysés par ultracentrifugation sur gradient de saccharose présentent un profil de marquage précoce du RNA tout à fait semblable à celui qui est obtenu dans les conditions primitives : ils se localisent essentiellement dans la zone 20-50 S. Cependant, ce traitement par le HFI réduit sensiblement le taux d'extraction des préribosomes, qui, en marquage passe de 90 % à 15 % ; l'analyse des préribosomes, et en particulier des éléments précoces, n'est plus alors possible que pour une faible part des éléments nucléolaires, ce qui réduit considérablement la portée de leur étude. Nous avons précédemment observé que le taux d'extraction des préribosomes décroissait régulièrement quand la concentration en Mg^{2+} du milieu d'extraction augmentait : 55 % à 7 mM, 15 % à 20 mM et 4 % à 300 mM. Il est donc probable que l'extraction est rendue plus difficile, après le lavage par le HFI, par la présence d'une concentration relativement élevée de Mg^{2+} restant fixée sur les nucléoles ainsi lavés. C'est pourquoi, après le traitement par le HFI, nous avons éliminé le Mg^{2+} par lavage des nucléoles par l'E.D.T.A. (10 mM), avant d'extraire les préribosomes par l'héparine, en l'absence de Mg^{2+} . Ce procédé s'est révélé efficace à la fois du point de vue du taux d'extraction et de la préservation de l'ARN nucléolaire. Cependant, pour une comparaison plus valable de nos résultats avec ceux d'autres auteurs (WARNER -1967-) ; AUGER et al. -1973-), nous avons réalisé le processus complet d'isolement des nucléoles selon la méthode directe par PENMAN (1966).

Dans ces nouvelles conditions d'isolement, nous avons pu retrouver encore, après analyse sur gradient de densité, les éléments contenant l'ARN précoce dans la zone 20-50 S (fig. 7 a). L'analyse de l'ARN

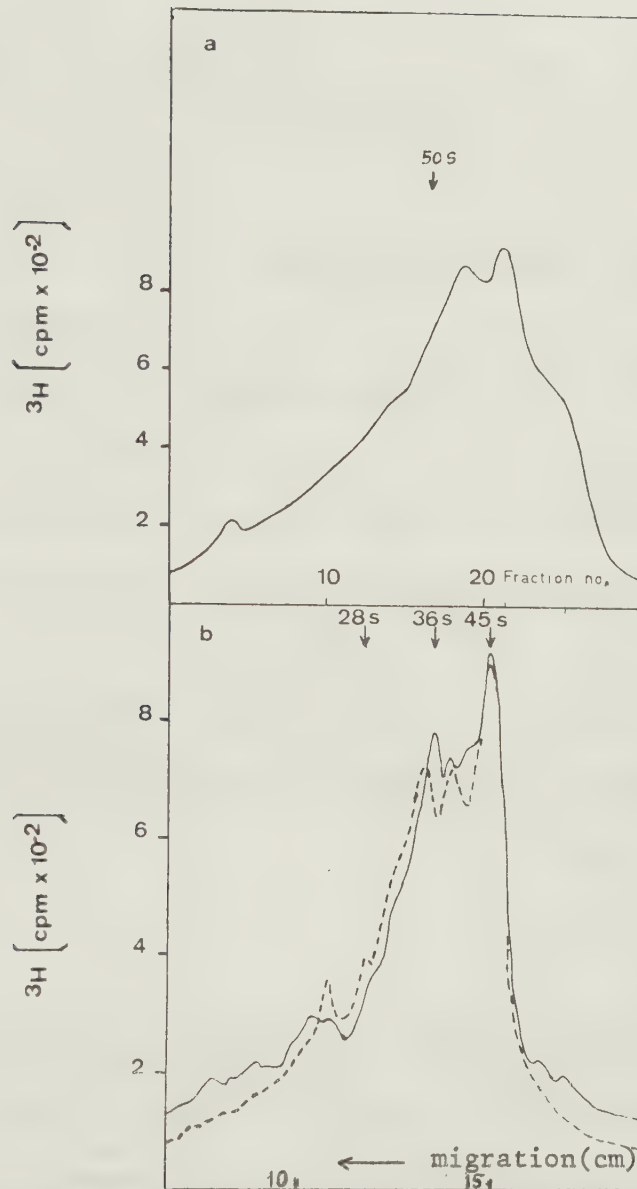


Fig. 7 : PROFIL DE SEDIMENTATION DES ELEMENTS NUCLEOLAIRES DONT L'ARN SE MARQUE RAPIDEMENT ,EN L'ABSENCE D'HYDROLYSE IN VITRO DE L'ARN 45 S.

a) Après 3 minutes de marquage par l'uridine (^3H), les nucléoles sont isolés des cellules d'hépatome ascitique par le procédé à haute force ionique et les éléments subnucléolaires sont extraits par traitement par l'héparine. L'analyse par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose comme décrit fig. I.

b) Profil en radioactivité, après analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose, de l'ARN nucléolaire total ,extrait soit avant la lyse des nucléoles (—), soit après la lyse nucléolaire (----).

rapidement marqué extrait avant ou après la lyse nucléolaire montre l'absence de dégradation *in vitro* (fig. 7 b).

Isolement des nucléoles à haute force ionique

La méthode est dérivée de celle décrite par PENMAN (1966) et appliquée à des cellules HeLa. Diverses modifications ont dû lui être apportées, en fonction des caractéristiques du matériel cellulaire que nous avons utilisé. Ainsi, la concentration en ion Mg^{2+} des milieux d'ouverture des cellules a été légèrement augmentée de façon à mieux préserver les structures nucléaires.

D'autre part, des stades supplémentaires d'homogénéisation ont été introduits pour éliminer au maximum les contaminations cytoplasmiques des préparations de noyaux isolés.

Mode Opératoire

Le culot de cellules d'hépatome ascitique (environ 10^8 cellules) est remis en suspension dans 5 ml de milieu TMN glacé (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 2,5 mM $MgCl_2$; 10 mM NaCl). Toutes les opérations ultérieures sont effectuées à 4°C. Après quelques minutes, 0,8 ml d'un mélange contenant 6,7 % de Tween 40 et 3,3 % de déoxycholate de sodium sont ajoutés à la suspension qui est à nouveau homogénéisée comme précédemment pendant une dizaine de minutes. Au microscope à contraste de phase, on peut constater que les cellules gonflent puis éclatent ; les noyaux n'apparaissent pas lésés, tandis que la partie cytoplasmique se disperse progressivement. Les noyaux, auxquels restent liées d'importantes régions cytoplasmiques sont recueillis par 5 minutes de centrifugation à 160 g (Jouan E 95) dans des tubes coniques en verre. Le culot est ensuite remis en suspension dans 5 ml de milieu TMN puis la suspension est homogénéisée avec un appareil de DOUNCE (50 coups). 0,4 ml de mélange Tween 40-déoxycholate sont ajoutés à la suspension et l'homogénéisation est poursuivie (10 coups supplémentaires) avant addition de 5 ml supplémentaires de milieu TMN à la suspension. Après une nouvelle homogénéisation, les noyaux sont recueillis par centrifugation et les débris cytoplasmiques restants sont éliminés en majeure partie après nouvelle homogénéisation à l'appareil de DOUNCE dans le milieu TMN. Les noyaux purifiés, recueillis après 5 minutes de centrifugation à 500 g, sont remis en suspension dans 2 ml de milieu HFI

(haute force ionique) contenant Tris-HCl pH 7,4 (10 mM) , NaCl (0,5 M) et $MgCl_2$ (50 mM). Les noyaux éclatent et la suspension devient filante. 100 $\mu g/ml$ de DNAase I (Worthington, électrophorétiquement pure) sont ajoutés et la suspension est agitée vigoureusement par pipettages pendant 25 minutes environ. La viscosité de la suspension est alors très réduite et au microscope à contraste de phase on observe une absence à peu près complète de mottes de chromatine non-nucléolaire. Les nucléoles sont recueillis après 5 minutes de centrifugation à 1500 g.

Extraction des préribosomes

Elle est obtenue par le traitement à l'héparine. Le mode opératoire a subi quelques modifications par rapport à la technique précédente. En effet, pour une comparaison plus valable de nos résultats avec ceux d'AUGER et TIOLLAIS (1973) nous avons suivi exactement le protocole utilisé par ces auteurs qui avaient appliqué notre procédé d'extraction des préribosomes nucléolaires à des cellules murines L 5178 Y.

Les nucléoles sont lavés dans 1 ml de milieu T- Na (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 10 mM NaCl) contenant de l'EDTA (10 mM) et du PVS (100 $\mu g/ml$), puis remis en suspension dans 1 ml de milieu T- Na en présence de 0,50% (p/v) d'héparine et de 100 $\mu g/ml$ d'ARN de levure purifié non marqué. Après 15 minutes d'agitation vigoureuse, la suspension est centrifugée 10 minutes à 25 000 g et l'extrait nucléolaire (surnageant 25 000 g) est analysé par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose (15-30 %) dans le milieu T- Na, pendant 2 heures à 42 000 t/mn (rotor Spinco SW 50).

Résultats :

Les éléments extraits de nucléoles isolés des cellules d'hépatome ascitique marquées pendant 3 minutes à l'uridine (3H) (50 $\mu C/ml$) sont analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose. Le profil de radioactivité obtenu est montré figure 7.a. L'ARN extrait des fractions 20-50 S est extrait et analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose. Le profil de radioactivité de l'ARN nucléolaire total, extrait d'une partie aliquote de la préparation de nucléoles isolés est également déterminé. Les résultats (fig. 7 b) montrent l'absence à peu près complète de dégradation de l'ARN nucléolaire au cours de l'isolement des préribosomes.

Conclusion :

Dans des conditions d'isolement où la dégradation *in vitro* de l'ARN nucléolaire rapidement marqué est très réduite, les éléments extraits du nucléole et contenant l'ARN 45 S nouvellement synthétisé se distinguent des préribosomes de 80 S, qui contiennent un ARN de 45 S plus "âgé", par des vitesses de sédimentation nettement inférieures (20 à 50 S).

AUGER et TIOLLAIS (1973), utilisant les conditions d'extraction nucléolaires qui viennent d'être définies, ont observé qu'après 6 minutes d'incorporation d'uridine (^3H), la majeure partie de l'ARN de type 45 S marqué se trouve sous forme de RNP de 80 S, et n'ont pas détecté de marquage précoce d'éléments distincts des préribosomes de 80 S. Nous avons nous-même observé un déplacement important de la radioactivité des fractions 20-50 S vers les fractions de type 80 S entre 3 et 6 minutes d'incorporation d'uridine (^3H). Il est donc probable que les éléments contenant l'ARN 45 S précoce, que nous avons mis en évidence, n'ont pu être observés par ces auteurs du fait du temps de marquage utilisé, trop long comparativement à la durée de vie de ces éléments. Il est également possible que ce résultat tienne à la différence de nature du matériel cellulaire utilisé. Cependant, quand nous avons réalisé la même étude cinétique du devenir de l'ARN nouvellement synthétisé sur des cellules de mammifères d'origine différente (HeLa ou CHO, se développant en culture *in vitro*), nous avons pu obtenir des résultats tout à fait identiques.

6. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ELEMENTS CONTENANT L'ARN NUCLEOLAIRE 45 S

PRECOCE

Ces éléments peuvent être détectés après 3 minutes de marquage de l'ARN.

Cependant, leur caractérisation est rendue difficile par :

- leur faible abondance relative dans le nucléole, du fait de leur courte durée de vie ;
- la présence dans ces fractions des chaînes d'ARN en cours de synthèse qui contiennent près de 50 % de la radioactivité incorporée en ARN ;
- l'absence d'espèce discrète, du point de vue des vitesses de sédimentation ;
- la présence, en quantités importantes, de RNPs plus maturées, de vitesses de sédimentation voisines (préribosomes de 55 S, contenant l'ARN nucléolaire de 32 S) ;

- l'impossibilité de réaliser de véritables "chasses" du marquage par l'uridine (^3H) de manière à suivre avec précision le devenir de l'ARN nouvellement synthétisé.

Nous avons pu observer en effet que l'addition à la suspension cellulaire de concentrations élevées de précurseur non radioactif ne suffit pas à stopper l'incorporation de radioactivité par les cellules, l'entrée de précurseur dans les cellules augmentant avec sa concentration externe. Par ailleurs, l'utilisation d'antibiotiques, inhibant plus ou moins spécifiquement toute nouvelle synthèse d'ARN préribosomique, introduit généralement des effets secondaires qui peuvent fausser toute interprétation, par la mise en jeu de mécanismes intracellulaires de régulation. Ainsi il a pu être montré qu'une inhibition de la transcription de l'ARN précurseur ribosomique pouvait entraîner le ralentissement ou l'arrêt de la maturation des ARNs ribosomiques préformés (KUMAR - WU -1973-).

L'étude que nous avons engagée avait deux objectifs :

- 1.- Déterminer si cet ARN 45 S nouvellement synthétisé était engagé dans des complexes RNPs.
- 2.- Examiner si ces molécules d'ARN présentaient des caractéristiques particulières par rapport à l'ensemble de l'ARN de 45 S nucléaire.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent : que cet ARN est complexé à des protéines nucléolaires et qu'il ne diffère pas, d'après les critères retenus, de l'ARN 45 S nucléolaire total. Ces derniers résultats et ceux que nous avons exposés plus haut suggèrent donc que ces éléments RNPs, retrouvés dans la zone 20-50 S et qui contiennent un ARN de type 45 S rapidement marqué représentent un stade précurseur dans la formation des préribosomes de 80 S.

a) ETUDE DE LA NATURE RNP DES ELEMENTS CONTENANT L'ARN 45 S RAPIDEMENT

MARQUE

Deux méthodes indépendantes ont été utilisées.

1.- La rétention sur filtre de nitrocellulose :

Les membranes de nitrocellulose ne retiennent pas, dans des milieux à basse force ionique, l'ARN "nu", mais retiennent complètement les complexes RNPs.

Technique : Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique marqués pendant 3 minutes par l'uridine (^3H) selon la technique à haute force ionique, décrite plus haut (p.21). Les éléments contenant l'ARN 45 S nouvellement synthétisé sont retrouvés dans les fractions 20-50 S après analyse sur gradient de saccharose de l'extrait nucléolaire obtenu par traitement à l'héparine. Ces fractions sont rassemblées et des parties aliquotes sont filtrées sur membranes de nitrocellulose (Millipore Ha 0,45 μ), selon la technique décrite par BALTIMORE et HUANG (1970). Les parties aliquotes sont diluées par du milieu TNa (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 10 mM NaCl) jusqu'à atteindre un volume de 2 ml et filtrées très lentement sur la membrane préalablement imbibée du même milieu TNa. Le filtre est ensuite lavé deux fois par 2 ml de milieu TNa et la radioactivité retenue est mesurée par comptage direct en présence de 10 ml de liquide scintillant.

Résultats : Ils sont décrits dans le tableau 1. Les valeurs obtenues sont comparées à celles déterminées pour les RNPs nucléolaires 80 et 55 S, isolées de cellules marquées pendant 30 minutes à l'uridine (^3H), et pour des ribosomes cytoplasmiques, isolés de cellules marquées 24 heures par l'uridine (^3H).

L'ARN 45 S nouvellement synthétisé retrouvé dans les fractions 20-50 S est retenu à peu près totalement, tout comme les RNPs nucléolaires de 80 et 55 S et les ribosomes cytoplasmiques.

Par contre, si l'ARN est extrait des fractions 20-50 S avant filtration, il n'est plus retenu par le filtre, tout comme l'ARN extrait

Tableau I : CONTENU EN PROTEINES DES RNPs NUCLEOLAIRES

Les éléments subnucléolaires extraits des nucléoles isolés par traitement par l'héparine sont séparés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose, dans les conditions décrites fig.2 .

Les fractions correspondant aux zones 20-50 S (dans le cas où les cellules d'hépatome ascitique ont été marquées pendant 3 mn par l'uridine (^3H)) et 50-90 S (cellules marquées pendant 30 mn) ont été respectivement rassemblées et leur densité de flottation a été mesurée après ultracentrifugation sur un gradient neutre de CsCl .

Sur des parties aliquotes des fractions d'éléments subnucléolaires, une mesure de la rétention sur filtre de nitrocellulose est faite, à basse force ionique.

Une expérience parallèle est réalisée après addition d'ARN de levure non marqué (concentration finale 200 $\mu\text{g/ml}$) à la suspension de nucléoles isolés, avant traitement par l'héparine.

	RETENTION SUR NITROCELLULOSE (%)	DENSITE DE FLOTTATION (g/ml)	CONTENU EN PROTEINES % Calculé d'après la densité.
ELEMENTS CONTENANT L'ARN RAPIDEMENT MARQUE (Conditions Standard)	89	1,60	36
ELEMENTS CONTENANT L'ARN RAPIDEMENT MARQUE (Extraction en présence d'ARN exogène)	77	1,63	32
PRERIBOSOMES 80-55 S (Conditions Standard)	93	1,53	46
PRERIBOSOMES 80-55 S (Extraction en présence d'ARN exogène)	100	1,53	46

des ribosomes cytoplasmiques.

En vue de réduire les possibilités de formation de complexes RNPs non spécifiques durant l'extraction nucléolaire, la même expérience a été réalisée, après addition d'ARN de levure non marqué avant d'effectuer la lyse des nucléoles, de façon à diluer fortement l'ARN nucléolaire endogène (plus de 10 fois). Dans ces nouvelles conditions, les taux de rétention ne sont pas modifiés sensiblement. Si elle est significative, la légère réduction qui est observée est du même ordre pour les éléments 20-50 S que pour les préribosomes 80 et 55 S.

2.- Détermination de densité de flottation

L'analyse par centrifugation isopycnique des éléments contenant l'ARN nucléolaire 45 S nouvellement synthétisé a été réalisée d'après la technique de BALTIMORE et HUANG (1968), dans les conditions décrites plus haut (voir p. 57).

Après fixation par le glutaraldéhyde des fractions 20-50 S séparées sur gradient de saccharose, extraites de cellules marquées pendant 3 minutes à l'uridine (^3H), les éléments sont analysés sur des gradients préformés de chlorure de césium (33-55 %).

Résultats :

La majeure partie (80 % environ) de l'ARN marqué retrouvé dans les fractions 20-50 S après 3 minutes d'incorporation d'uridine (^3H), se localise dans une zone correspondant à des densités comprises entre 1,59 et 1,62 g/cm³ (de l'ARN "nu", non lié à des protéines, à une densité voisine de 1,90 g/cm³). De cette valeur moyenne de densité on peut calculer une teneur approximative en protéines (LIAU et al.-1969-).

Les teneurs ainsi calculées sont indiquées dans le tableau 1. En fait, ces valeurs doivent être interprétées avec précaution.

Récemment, il a été montré, par Mc CONKEY (1974), que les hypothèses retenues pour ce type de détermination -à savoir, (1) Une conservation complète des protéines du complexe lors de la fixation et de l'analyse et (2) L'existence d'une relation linéaire entre teneur en protéines et densité de flottation du complexe- devaient être reconsidérées. En conséquence, les % en protéines qui apparaissent dans le tableau ne peuvent avoir qu'une valeur approximative.

Cependant, la valeur obtenue pour les RNPs contenant l'ARN 45 S précoce est légèrement inférieure à la valeur moyenne précédemment trouvée pour les préribosomes plus maturés de 80 et 55 S. Cette observation est à rapprocher de la plus grande sensibilité à la dégradation in vitro de l'ARN qu'elles contiennent. Dans ces RNPs, l'ARN pourrait ainsi être mieux accessible aux nucléases nucléolaires que dans les préribosomes de type 80 S.

Les densités mesurées pour les éléments 20-50 S contenant l'ARN précocement marqué ne sont pas modifiées si l'extraction nucléolaire est effectuée après l'addition de concentrations élevées d'ARN exogène non marqué (voir paragraphe précédent). La détection de ces éléments sous forme de complexes RNPs, d'après les deux procédés utilisés, ne semble pas donc pas due à une simple adsorption non-spécifique de protéines nucléolaires sur l'ARN survenant au cours de l'isolement des préribosomes.

b) ANALYSE DE L'ARN DES ELEMENTS RAPIDEMENT MARQUES .

Diverses expériences ont été réalisées en vue de déterminer si ce type d'ARN se retrouvait ultérieurement intégré dans les préribosomes de 80 S. Faute de pouvoir réaliser, dans les conditions favorables, une

"chasse" du marquage précoce en ARN, des approches indirectes ont dû être choisies.

Nous avons pu montrer que cet ARN possédait les caractéristiques d'un ARN ribosomique - sensibilité de sa biosynthèse à de faibles doses d'actinomycine D, méthylation rapide de la molécule nouvellement synthétisée - et qu'il ne semblait pas pouvoir correspondre à un ARN hétérogène nucléaire d'éventuelle origine extranucléolaire (absence de segment poly (A) dans la molécule). Enfin, les résultats d'expériences d'hybridation moléculaire entre cet ARN et l'ADN nucléolaire paraissent indiquer que l'ARN 45 S des éléments 20-50 S et celui des préribosomes de 80 S sont des molécules dont la structure primaire est très analogue. Les RNPs que nous avons décrites peuvent donc constituer des éléments précurseurs des préribosomes de type 80 S.

1.- Détection d'éventuelles régions poly (A) dans la molécule

Les ARNs de type messenger, à l'exception de ceux codant pour les histones — SCHOCHETMAN et PERRY (1972), ADESNIK et DARNELL (1972) — ainsi qu'une proportion importante de l'ARN hétérogène nucléaire à haute masse molaire (Hn RNA) — EDMONDS et al. (1971), DARNELL et al. (1971) — contiennent un segment d'acide polyadénylique (poly (A)), d'environ 200 nucléotides de long, qui est lié de façon covalente au reste de la molécule. Les propriétés spécifiques de cette région poly (A) peuvent permettre l'identification et la séparation de cette classe d'ARNs. En particulier, à force ionique élevée, les membranes de nitrocellulose (Millipore HA 0,45 μ) retiennent les ARNs qui contiennent des

régions poly (A), tandis que les ARNs qui en sont dépourvus ne sont pas retenus — LEE et al. (1971) .

Résultats :

Les cellules d'hépatome ascitique sont marquées pendant 3 minutes par l'uridine (^3H). Les nucléoles sont isolés par la technique à haute force ionique puis l'ARN nucléolaire est extrait (voir p. 22). Le précipité d'ARN nucléolaire est redissous dans le milieu à haute force ionique, utilisé par LEE et al. (1971), contenant KCl (0,5 M) et Tris-HCl.

Le pourcentage d'ARN précocement marqué qui est retenu sur le filtre dans ces conditions est inférieur à 2 %, valeur identique à celle obtenue pour l'ARN ribosomique cytoplasmique extrait des mêmes cellules, utilisé comme contrôle.

2.- Sensibilité à de faibles doses d'actinomycine D

L'actinomycine D bloque la transcription de l'ADN. La molécule d'antibiotique s'intercale vraisemblablement entre des paires de base G-C adjacentes et empêche ainsi le déplacement de l'ARN polymérase le long de la molécule d'ADN.

A des concentrations relativement élevées (égales ou supérieures à 1 $\mu\text{g/ml}$), l'inhibition de la transcription concerne tous les types d'ARN. Pour des doses plus faibles, on peut prévoir que le taux d'inhibition, pour la synthèse d'une classe donnée d'ARN, sera une fonction croissante de la taille de la molécule et de sa teneur en (GC). PERRY et al. (1970) ont pu observer que la biosynthèse de l'ARN préribosomique de 45 S est environ 100 fois plus sensible à l'action de l'actinomycine qu'un ARN nucléaire extranucléolaire de même taille. Selon cet auteur, cette sensibilité serait due, en plus des deux facteurs qui viennent d'être cités — longueur de chaîne d'ARN, teneur en (GC) — à la redondance des cistrons ribosomiques : ainsi, dans l'hypothèse d'une transcription continue de l'ensemble de gènes, une seule molécule d'actinomycine D pourrait bloquer l'expression de plusieurs gènes. Des doses d'actinomycine D voisines de 0,08 $\mu\text{g/ml}$ inhibent sélectivement la transcription d'ARN ribosomique, sans modification sensible de la biosynthèse des autres types d'ARN (PERRY - 1970)

Les cellules d'hépatome ascitique sont traitées, pendant incubation in vitro, par une faible concentration d'actinomycine D (0,08 $\mu\text{g/ml}$). 20 minutes après l'addition de l'antibiotique, de l'uridine (^3H) (10 $\mu\text{Ci/ml}$) est ajoutée à la suspension cellulaire. Après 3 minutes d'incorporation, les cellules sont recueillies, les nucléoles sont isolés et les éléments subnucléolaires sont extraits par traitement par l'héparine, puis analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose.

Des cellules-témoins ont été marquées par l'uridine (^3H) dans des conditions identiques, mais en l'absence d'un traitement par l'actinomycine D, et les éléments subnucléolaires séparés sur gradient.

Les profils de radioactivité obtenus après séparation sur gradient sont qualitativement analogues : marquage localisé essentiellement dans les fractions 20-50 S. Si la radioactivité mesurée dans les deux cas (cellules traitées et cellules témoins) est ramenée au nombre de nucléoles isolés dans chaque préparation, on peut constater que la radioactivité spécifique des éléments 20-50 S, après traitement par l'actinomycine D, n'est égale qu'à 10 % environ de celle mesurée sur ces éléments isolés des cellules témoins. Ce taux d'inhibition est identique à celui qu'on peut mesurer pour l'ARN nucléolaire total après 15 minutes d'incorporation d'uridine (^3H), dans les mêmes conditions de traitement par l'actinomycine D.

Conclusion :

En ce qui concerne la sensibilité de sa biosynthèse à de faibles doses d'actinomycine D, l'ARN rapidement marqué, retrouvé dans les fractions 20-50 S, ne diffère pas des ARNs nucléolaires prérribosomiques.

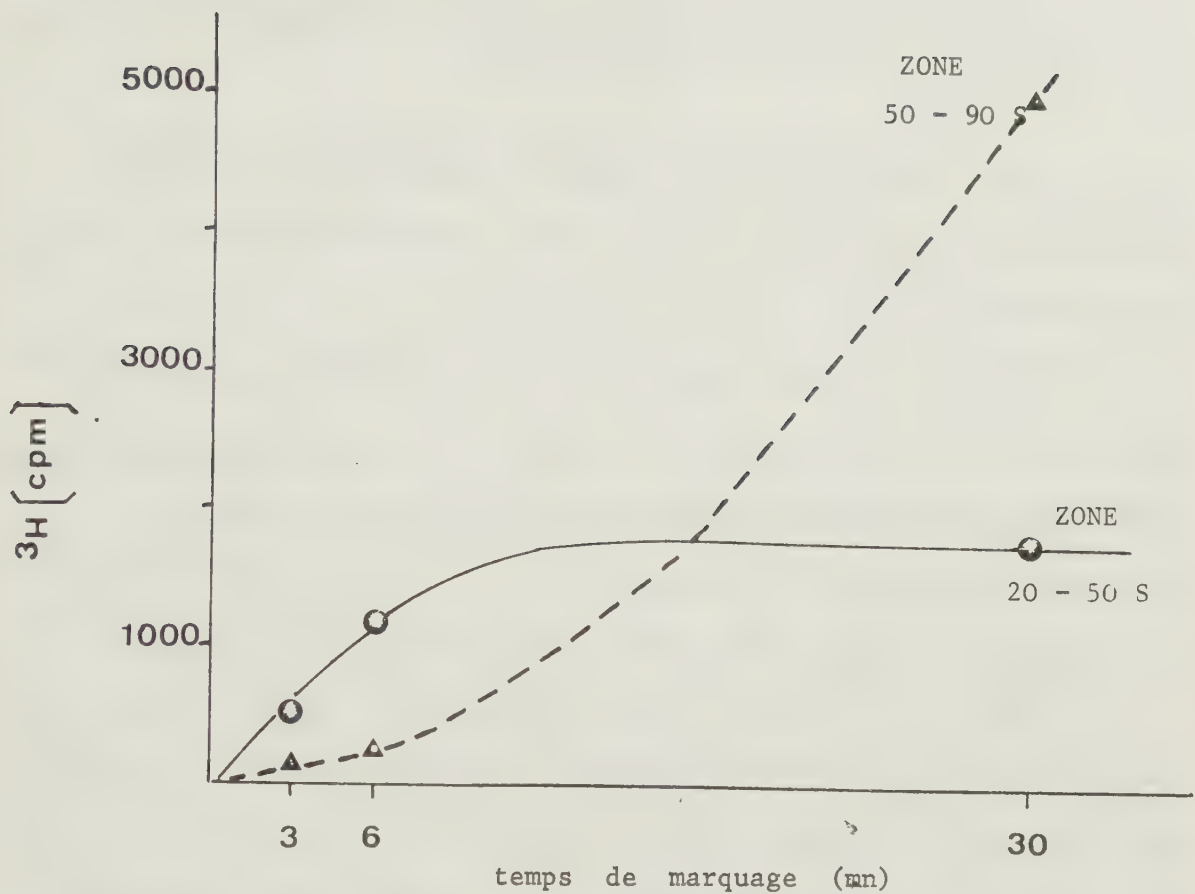


Fig. 8: CINETIQUE DE METHYLATION DE L'ARN DES RNPs NUCLEOLAIRES.

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées in vitro pendant 3,6 ou 30 minutes par la L-méthionine (^3H -methyl). Les RNPs nucléolaires sont extraites puis analysées par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, comme décrit fig.7. L'ARN est extrait de fractions du gradient et la radioactivité incorporée est mesurée.

Deux régions du gradient sont considérées :

- Zone 50-90 S contenant les préribosomes de 80 et 55 S (---).
- Zone 20-50 S contenant les éléments dont l'ARN se marque rapidement (—).

3.- Méthylation de l'ARN

La méthylation d'ARN à masse molaire élevée est caractéristique de l'ARN de type ribosomique. GREENBERG et PENMAN (1966) ont montré que cette méthylation a lieu dans le nucléole et qu'elle commence probablement sur les chaînes naissantes de l'ARN précurseur.

Nous avons étudié la cinétique de méthylation des éléments extraits du nucléole par traitement par l'héparine et analysés sur gradient de saccharose.

Les cellules d'hépatome ascitique sont marquées par incorporation de méthionine — méthyl (^3H) — pendant 3, 6 ou 30 minutes, dans le milieu de culture normal (FISCHER), dépourvu de méthionine froide et additionné d'adénosine et de guanosine ($2 \times 10^{-5}\text{M}$) pour réduire le marquage des bases puriques comme décrit par WEINBERG et al. (1967).

Après traitement par l'héparine des nucléoles isolés, dans les conditions où la dégradation in vitro de l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé est minimum, l'extrait nucléolaire est séparé par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. L'ARN est ensuite extrait de fractions du gradient, de façon à éliminer le marquage qui a pu être incorporé dans des protéines. Les fractions correspondant aux deux zones suivantes sont rassemblées avant l'extraction de l'ARN : zone 20-50 S et zone 50-90 S (contenant les éléments RNPs 80 et 55 S).

La radioactivité de ces deux fractions est alors mesurée. Les variations de l'activité spécifique de ces deux fractions en fonction du temps de marquage sont montrées fig. 8. Il apparaît nettement que l'ARN localisé dans la zone 20-50 S est rapidement méthylé. Puis, en quelques minutes, la majeure partie du marquage en groupements méthyle est localisée au niveau des fractions contenant les préribosomes de 80 et 55 S.

L'évolution observée est analogue à celle qui a été mise en évidence au cours de cinétiques d'incorporation d'uridine (^3H). Elle est compatible avec l'existence d'une relation de précurseur à produit entre ces deux classes d'éléments nucléolaires.

4.- Hybridation moléculaire entre ARN et ADN nucléolaire

En vue de déterminer quelle proportion d'ADN nucléolaire code pour l'ARN ribosomique, une expérience d'hybridation moléculaire entre ARN ribosomique cytoplasmique et ADN nucléolaire total a été réalisée.

Mode Opératoire :

La technique de STAMBROOK (1974) a été utilisée sur les cellules CHO.

a) Isolement de l'ARN

L'ARN nucléolaire extrait de cellules CHO marquées pendant 3 minutes par l'uridine (^3H) ($100 \mu\text{C}/\text{ml}$) est analysé sur gradient de densité de saccharose (15-30 %) dans un tampon contenant NaCl (0,1 M), Tris- HCl pH 7,4 (10 mM), EDTA (0,1 M) et 0,5 % SDS par 150 minutes de centrifugation à 42 000 t/mn (rotor Spinco SW 50.1) à température ambiante. L'ARN des fractions de vitesses de sédimentation 40 à 45 S est précipité par l'éthanol et purifié sur colonne Séphadex G 100 (voir plus haut). Sa radioactivité spécifique est de 21 000 cpm/ μg .

L'ARN nucléolaire qui est ainsi isolé est en réalité une population de vitesse de sédimentation comprise entre 45 S et 40 S. La taille moyenne de l'ARN précocement marqué utilisé est donc inférieure, de façon significative, à celle d'une population homogène de 45 S.

L'ARN ribosomique est isolé comme indiqué précédemment (p. 25) de cellules CHO marquées pendant 24 heures par l'uridine (^3H) ($10 \mu\text{C}/\text{ml}$). L'ARN obtenu après précipitation par l'éthanol est dissous dans un tampon contenant KCl (50 mM) puis séparé sur une colonne de Sephadex G 100 (dimensions : diam. 2 cm x 9 cm). L'ARN qui est exclu est précipité par l'éthanol puis séparé sur gradient de densité de saccharose (voir p. 23). Les fractions contenant les espèces 28 et 18 S sont rassemblées et reprécipitées par l'éthanol. La radioactivité spécifique obtenue est $2,7 \cdot 10^5$ cpm/ μg d'ARN.

b) Isolement de l'ADN

L'ADN nucléolaire est extrait de nucléoles isolés de cellules CHO, par la méthode déjà décrite (Ch. I) après sonication des noyaux à basse force ionique ZALTA (1971). Les cellules ont été marquées pendant 24 heures par la thymidine (^{14}C), à $0,05 \mu\text{C}/\text{ml}$. Les nucléoles isolés (environ $2 \cdot 10^8$) sont solubilisés par addition de 2 ml d'une solution contenant : NaCl (0,15 M), EDTA (0,1 M) et 2 % de SDS. Le lysat obtenu

est agité modérément pendant 15 heures en présence d'un volume égal de phénol saturé en tampon. L'ADN est récupéré de la phase aqueuse par précipitation par l'éthanol. Cet ADN est redissous dans 1 ml de milieu 2 x SSC (le milieu 1 SSC correspond à 0,15 M NaCl, et 0,015 M en citrate de sodium), puis soumis successivement à un traitement par la

RNA ase (mélange de 50 µg/ml de RNAase A pancréatique et de 50 unités/ml de RNAase T1) pendant 45 minutes à 37°C, puis à un traitement par la pronase (100 µg/ml) pendant 1 heure à 37°C. La solution est ensuite réextraite par le phénol et l'ADN précipité par l'éthanol puis redissous dans un tampon borate (10 mM borate de sodium, pH 9,2) avant d'être soumis à une analyse en densité de flottation par ultracentrifugation isopycnique en présence de chlorure de césium.

5,385 g de CsCl sont ajoutés à 4,2 ml de solution d'ADN (contenant entre 50 et 100 µg d'ADN nucléolaire) de manière à obtenir une densité finale de 1,700 g/cm³. Après 70 heures de centrifugation à 35 000 t/mn (rotor Spinco 50), à température ambiante, 40 fractions sont recueillies de chaque tube et leur contenu en ADN est déterminé par comptage de la radioactivité (¹⁴C) sur des parties aliquotes. Les fractions contenant l'ADN sont rassemblées. Après dialyse contre le milieu 0,1 SSC, l'ADN est dénaturé (il est porté 10 minutes à 100°C puis refroidi rapidement) puis fixé sur des membranes de nitrocellulose (Sartorius 0,45 µm 25 mm de diamètre) par filtration de la solution. L'activité spécifique de cet ADN est de 160 cpm/µg.

c) Hybridation

Elle est réalisée à 40°C pendant 40 heures dans une solution contenant 50 % de formamide dans le milieu 2 x SSC dans les conditions décrites par STAMBROOK (1974). Un filtre est placé dans un flacon en verre contenant des concentrations variables d'ARN ribosomique dans un volume final de 0,5 ml. La phase liquide est recouverte par une mince couche d'huile de paraffine, de manière à éviter toute évaporation pendant l'incubation.

Après incubation, les filtres sont lavés trois fois dans le milieu 2 x SSC, traités deux fois par RNA ase pancréatique (50 µg/ml) pendant 20 minutes à température ambiante, puis relavés plusieurs fois avant mesure de la radioactivité restante.

ARN ribosomique

Des fractions d'environ 15 µg d'ADN nucléolaire marqué par la thymidine (¹⁴C) sont incubées en présence de quantités croissantes d'ARN ribosomique cytoplasmique marqué par l'uridine (³H). Pour des concentrations élevées en ARN, la quantité d'ARN hybridé à l'ADN atteint un plateau, correspondant à l'hybridation de toutes les séquences d'ADN

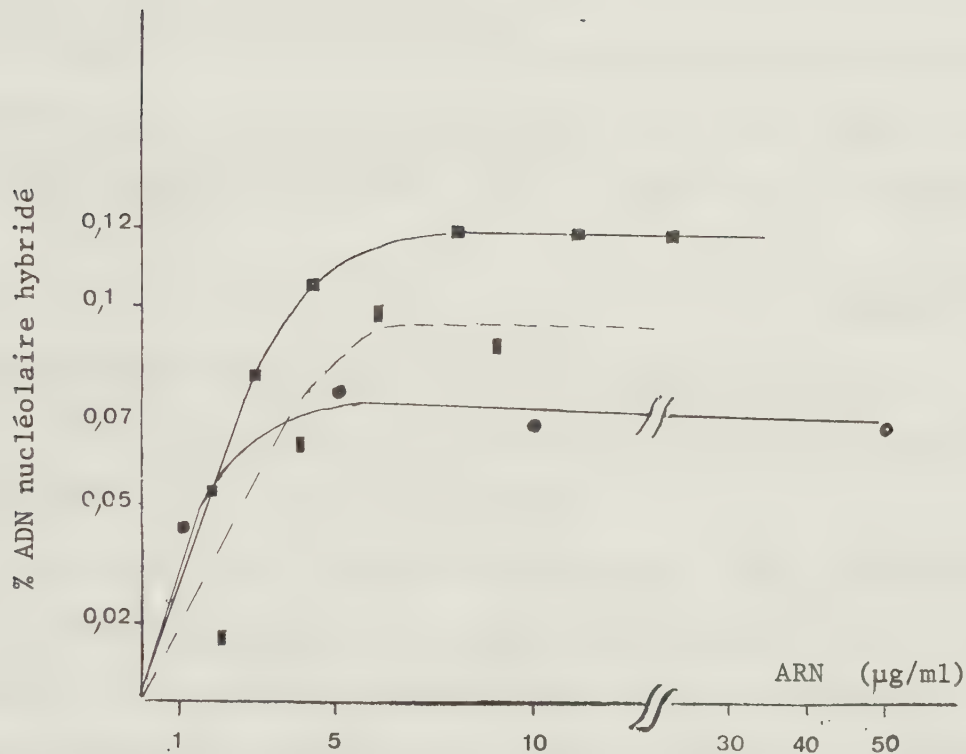


Fig. 9 : HYBRIDATION DE L'ARN NUCLEOLAIRE RAPIDEMENT MARQUE AVEC L'ADN NUCLEOLAIRE.

Des filtres contenant 15 μg d'ADN nucléolaire marqué par la thymidine (^{14}C) sont placés dans 0,5 ml de 2xSSC, contenant 50 % de formamide et l'hybridation est effectuée à 37°C pendant 60 heures, en présence de concentrations croissantes d'ARN ribosomique cytoplasmique, marqué par l'uridine (^3H) et ayant une activité spécifique de 3×10^5 cpm/ μg , ou bien en présence de d'ARN nucléolaire rapidement marqué (3 minutes de marquage par l'uridine (^3H), activité spécifique de 2×10^4 cpm/ μg).

Le pourcentage d'ADN nucléolaire hybridé avec l'ARN marqué est montré, pour l'ARN ribosomique cytoplasmique (—●—) et pour l'ARN nucléolaire rapidement marqué (—■—). La courbe théorique correspondant à l'ARN précurseur ribosomique de 45 S (—■—) a été déterminée à partir de celle obtenue pour l'ARN ribosomique cytoplasmique.

complémentaires de celles de l'ARN ribosomique.

La valeur que nous avons obtenue indique que 0,07 % de l'ADN nucléolaire peut s'hybrider à l'ARN ribosomique cytoplasmique, ce qui correspond à 0,12 % pour l'ARN préribosomique de 45 S. En effet, la masse molaire de cette espèce est de $4,2 \cdot 10^6$ g alors que celle du total de l'ARN ribosomique cytoplasmique (28 S + 18 S) est d'environ $2,4 \cdot 10^6$ g.

ARN nucléolaire

L'aptitude à l'hybridation d'ARN nucléolaire rapidement marqué a été déterminée dans des conditions analogues (fig. 9).

La valeur obtenue correspondant au plateau (saturation) pour l'hybridation de l'ADN nucléolaire est de 0,10 %. Cette valeur est voisine de celle correspondant à l'ARN 45 S préribosomique (0,12 %). L'écart, relativement faible, avec la valeur théorique de 0,12 % peut correspondre au fait que, dans nos conditions expérimentales, la masse molaire moyenne de la fraction d'ARN rapidement marqué qui est isolé (fractions 45-40 S) est en réalité légèrement inférieure à $4,2 \cdot 10^6$ g.

Hybridation compétitive

Pour déterminer si l'ARN de 45 S nucléolaire à marquage rapide contient les séquences d'ARN ribosomique de 18 et 28 S, cet ARN nucléolaire marqué — 3 minutes d'incorporation par l'uridine (^3H) — a été mis en présence d'ADN nucléolaire (dans les conditions d'hybridation définies plus haut), en présence d'ARN ribosomique non marqué. L'ARN nucléolaire marqué est utilisé à une concentration saturante (conduisant au maximum d'hybridation de l'ADN nucléolaire) en présence d'une concentration largement supérieure (10 fois) d'ARN ribosomique non marqué.

Dans ces conditions, on observe une diminution importante de la quantité d'ARN nucléolaire marqué qui est hybridé à l'ADN (fig. 9). L'ARN ribosomique cytoplasmique déplace 40 % du marquage en ARN précoce qui peut s'hybrider à l'ADN nucléolaire.

Théoriquement, l'ARN ribosomique peut entrer en compétition avec 55 % des séquences du précurseur de 45 S (PERRY 1967) . Nous avons observé expérimentalement un taux de compétition de 40 % pour l'ARN 45 S précoce.

Il faut remarquer que, dans nos conditions de marquage court la région 5'P terminale de l'ARN préribosomique 45 S doit être moins fortement marquée (voir p. 7) que sa région 3'.OH terminale qui contient la plupart des séquences "extra-ribosomiques" non conservées (voir chap 1 schéma p. 30). Cet effet doit réduire le taux apparent de compétition par l'ARN ribosomique (28 S + 18 S) par rapport à ce que l'on pourrait observer avec un ARN précurseur marqué de façon uniforme tout au long de sa molécule.

CONCLUSION DU CHAPITRE

Avant d'être intégré dans le périosome de 80 S, l'ARN nucléolaire 45 S est associé de façon transitoire à des éléments RNPs de vitesse de sédimentation relativement faibles (de 20 à 50 S). Le contenu relatif en protéines de ces RNPs apparaît inférieur à celui des préribosomes de 80 S. L'ARN 45 S qu'elles contiennent est beaucoup plus sensible à l'action in vitro de nucléases nucléolaires que lorsqu'il est intégré dans les préribosomes de 80 S.

Les résultats qui ont été décrits dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication (BACHELLERIE et al. 1975 a). Le problème se pose actuellement de préciser les relations qui peuvent exister entre ces RNPs préribosomiques isolés et, d'une part, les éléments de type fibrillaire au niveau desquels se localise in situ l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé et, d'autre part, les RNPs naissants mis en évidence par MILLER (1972), lors d'études morphologiques de la transcription des gènes ribosomiques chez les eucaryotes.

CHAPITRE 4

ORIGINE ET DEVENIR DES PROTEINES NUCLEOLAIRES

ETUDE PRELIMINAIRE

Le nucléole, site de la biosynthèse des ARNs préribosomiques, est aussi le lieu de l'assemblage, au moins partiel, entre les ARNs préribosomiques et des protéines ribosomiques (WARNER -1967-)

Parallèlement à la séquence d'évènements concernant l'ARN précurseur ribosomique nouvellement synthétisé, nous avons été conduits à suivre le sort des protéines nucléolaires. Par des cinétiques rapides de marquage, nous avons pu préciser leur origine extra-nucléolaire et suivre leur devenir dans l'appareil nucléolaire. Nous avons pu établir que le transfert vers le nucléole de protéines nouvellement synthétisées à l'intérieur du nucléole était dépendant de la synthèse d'ARN préribosomique, et que la majeure partie de ces protéines se retrouve liée aux RNPs préribosomiques.

INTRODUCTION

Les protéines sont, du point de vue pondéral, le constituant nucléolaire majeur. Certaines ont un rôle essentiellement structural, d'autres ont des activités catalytiques bien définies. Une ARN polymérase-ADN dépendante est responsable de la transcription des gènes nucléolaires (ROEDER et RUTTER -1970-); une ou plusieurs méthylases doivent intervenir pour fixer des groupements méthyles sur le ribose en position 2'-OH, dans des régions définies de la molécule d'ARN précurseur ribosomique (MADEN et al.-1974-) Des RNAases entrent en jeu au cours de la maturation ribosomique, pour couper la chaîne ribonucléotidique de l'ARN précurseur au niveau de sites définis - des activités de type exo- et endo-nucléasique ont pu être identifiées (MIRAULT et SCHERRER -1972- WINICOVet PERRY -1974-) D'autres activités enzymatiques ont été caractérisées dans le nucléole isolé, notamment des protéines-kinases (GRUMMT -1974- KANG et al.-1974-)

Les protéines de type chromatinien et ribosomique sont présentes dans le nucléole (ORRICK et al.-1973-).

D'autres protéines nucléolaires enfin, doivent contribuer au maintien de la structure nucléolaire elle-même, en particulier celles qui constituent la partie nucléolaire dite "amorphe".

Divers auteurs ont montré que des nucléoles isolés peuvent incorporer des acides aminés dans des protéines au cours d'incubation *in vitro*. Cependant, les taux d'incorporation mesurées *in vitro* sont faibles et ne peuvent pas rendre compte des radioactivités spécifiques élevées qui sont atteintes au cours de marquages de cellules entières (MAGGIO -1966- IZAWA -1968-). Par ailleurs, les caractéristiques de l'incorporation par le système acellulaire nucléolaire les distinguent notablement du système polysomique cytoplasmique : insensibilité à la RNAase, à l'absence d'ATP et de système exogène régénérateur d'ATP, à la présence d'ion Mg^{++} et de diverses enzymes d'activation (IZAWA et al.-1968). Cette incorporation d'acides aminés radioactifs ne concerne qu'un nombre très réduit d'espèces protéiques (ZIMMERMANN et al.-1969-) et on ne peut écarter l'hypothèse qu'elle corresponde en fait à un processus différent d'une véritable synthèse protéique.

Des protéines de masse molaire identique à celles des protéines des ribosomes cytoplasmiques ont été retrouvées dans le nucléole associées à l'ARN préribosomique (WARNER et al.-1967-) Par ailleurs, divers auteurs (HEADY et Mc CONKEY -1970- CRAIG et PERRY -1971-) ont montré que des protéines ribosomiques peuvent être synthétisées *in vitro* dans un système microsomique acellulaire.

Pour mettre en évidence les mécanismes qui règlent l'élaboration des éléments préribosomiques, il importait de préciser l'origine de ces protéines, et de suivre leur devenir dans l'appareil nucléolaire. Dans ce but, nous avons entrepris une étude cinétique de marquage des protéines nucléolaires, par incorporation d'acides aminés radioactifs par les cellules entières. Nos résultats indiquent que la majeure partie des protéines qui apparaissent au niveau du nucléole sont synthétisées hors du nucléole. Le transfert intranucléolaire de protéines nouvellement synthétisées est dépendant de la biosynthèse d'ARN préribosomique à l'intérieur du nucléole. Les caractéristiques de ce transfert diffèrent selon les classes de protéines considérées.

Nous avons entrepris de déceler un éventuel flux de protéines nouvellement synthétisées vers le nucléole en comparant les variations de radioactivité spécifique des protéines nucléolaires à celles de l'ensemble des protéines cellulaires, lors de cinétiques d'incorporation d'acides aminés marqués. Dans l'hypothèse d'une synthèse de protéines dans le nucléole sans échange de protéines avec les régions extra-nucléolaires, le rapport de radioactivité spécifique entre les protéines nucléolaires et les protéines cellulaires totales doit rester constant quand la durée de marquage varie.

Par contre, l'arrivée dans le nucléole de protéines marquées nouvellement synthétisées doit se traduire par une augmentation corrélative du rapport de radioactivité spécifique, en fonction de la durée de marquage.

Sur la période courte considérée, nous admettrons que la part des protéines marquées qui sortent du nucléole peut être négligée, que la population cellulaire est en état de croissance régulière et que la distribution intracellulaire des acides aminés radioactifs est très rapidement équilibrée par rapport aux temps de marquage étudiés.

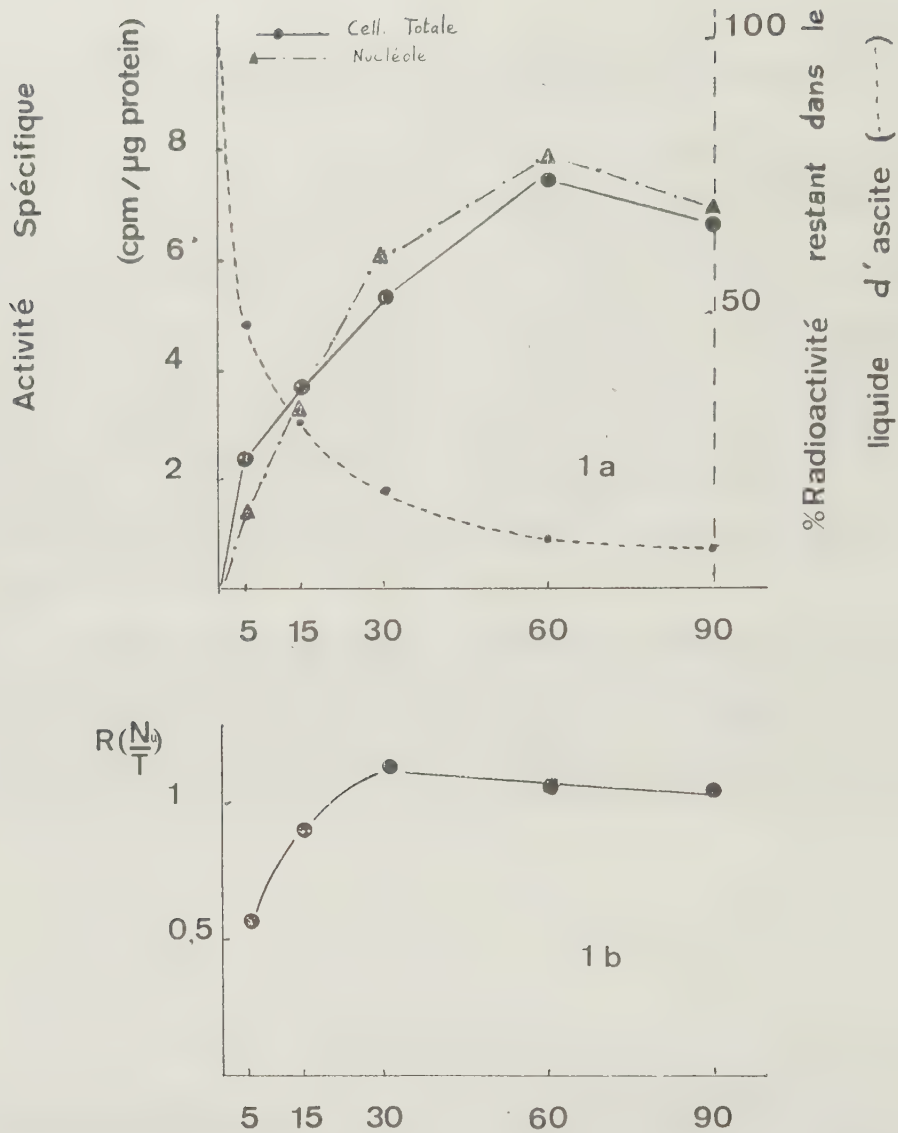


Fig. I : CINETIQUE DE MARQUAGE IN VIVO DES PROTEINES .

Après une injection intrapéritonéale de 200 μC de L-leucine (^3H), 5 ml d'ascite sont prélevés aux temps indiqués et l'incorporation est immédiatement arrêtée .

a) Evolution du pourcentage de radioactivité restant dans l'ascite (---) et de l'activité spécifique des protéines cellulaires totales (●—) et des protéines nucléolaires (▲—).

b) Variations du rapport $R = \frac{N_u}{T}$, rapport d'activité spécifique incorporée entre les protéines nucléolaires et les protéines cellulaires totales.

I. CINETIQUE DE MARQUAGE IN VIVO DES PROTEINES NUCLEOLAIRES.

Mode opératoire.

200 μ Ci de L-leucine (^3H) sont incorporés intrapéritonéalement à un rat au 3ème jour de croissance des cellules d'hépatome de Zajdela dans la poche ascitique. Aux temps indiqués, 5 ml de suspension ascitique sont prélevés et l'incorporation de radioactivité est arrêtée par dilution immédiate dans une solution saline glacée d'Earle. La radioactivité spécifique globale pour l'ensemble des protéines cellulaires est déterminée sur une partie aliquote de cellules marquées. Les protéines sont dosées par la méthode au Biuret, selon la technique décrite par GORNALL. La mesure de radioactivité est faite sur des parties aliquotes contenant environ 200 μ g de protéines après précipitation par l'acide trichloracétique (TCA) à 5 % puis traitement pendant 20 minutes à 90°C pour hydrolyser les leucyl (^3H)-ARN de transfert. Les précipités sont ensuite recueillis sur filtres en fibre de verre (WHATMAN GF/B) puis lavés par le TCA à 5 % avant mesure de la radioactivité au spectromètre Packard. Les protéines nucléolaires sont dosées selon la méthode de LOWRY.

Les résultats obtenus sont décrits fig. 1 . Les variations des radioactivités spécifiques des protéines cellulaires totales et des protéines nucléolaires en fonction de la durée du marquage sont montrés sur la fig. 1a. Nous avons également indiqué, pour les divers temps de marquage étudiés, le pourcentage de radioactivité initiale qui reste dans le liquide ascitique, non incorporé en protéines. La cinétique de marquage des protéines nucléolaires ne diffère pas nettement de celle de l'ensemble des protéines cellulaires. Cependant, il apparaît clairement que le marquage nucléolaire se fait avec un temps de latence par rapport à celui des protéines cellulaires totales. Nous avons indiqué fig. 1 b. les variations du rapport de radioactivité spécifique entre protéines nucléolaires et protéines cellulaires totales, en fonction du temps de marquage. Ce rapport croît rapidement dans les premières minutes : il double pratiquement entre 5 et 30 minutes, temps au bout duquel un palier semble atteint. Cette évolution, tout à fait reproductible, est compatible avec une arrivée dans le nucléole de protéines nouvellement synthétisées hors du nucléole.

Dans ces conditions de marquage, la concentration en précurseur radioactif dans le liquide d'ascite n'est pas constante : dès les premières

minutes, elle décroît très rapidement, la L-leucine (^3H) se répartissant progressivement dans tout l'animal. En conséquence, le taux d'incorporation de radioactivité dans les protéines cellulaires décroît constamment et au bout d'une heure environ, la radioactivité spécifique de ces protéines a atteint un palier.

Nous avons entrepris d'effectuer la même étude cinétique dans des conditions de marquage différentes, pouvant permettre d'obtenir un taux d'incorporation stable pour une meilleure interprétation des résultats.

2. MARQUAGE CONTINU IN VITRO.

Les cellules d'hépatome ascitique sont prélevées du rat et mises en suspension dans un milieu synthétique (MEM Eagle) dans les conditions décrites dans le chapitre I (voir page 10) qui permettent une croissance de la population cellulaire pendant plus d'un temps de génération. La suspension cellulaire est incubée à 37°C dans des flacons cylindriques en verre munis de barreau magnétique permettant une agitation continue.

Dans nos conditions expérimentales, la concentration de L-leucine (^3H) libre dans le milieu de culture reste pratiquement constante tout au long du marquage, la proportion d'acide aminé radioactif incorporé restant très faible; la radioactivité spécifique moyenne des protéines cellulaires croît linéairement avec le temps de marquage sur les intervalles étudiés (fig. 2 a).

Dans ces nouvelles conditions, le marquage des protéines nucléolaires s'effectue avec un certain temps de latence par rapport à l'ensemble des protéines cellulaires : l'évolution du rapport ($\frac{\text{Nu}}{\text{T}}$) est similaire à celle observée dans le cas précédent (fig. 2 b).

Expérience de "chasse".

Les cellules en suspension sont marquées pendant un temps très court par addition d'un acide aminé marqué. Au bout de cette période, l'incorporation est arrêtée par addition d'une concentration élevée d'acide aminé froid de manière à diluer le précurseur radioactif, tout en poursuivant l'incubation des cellules.

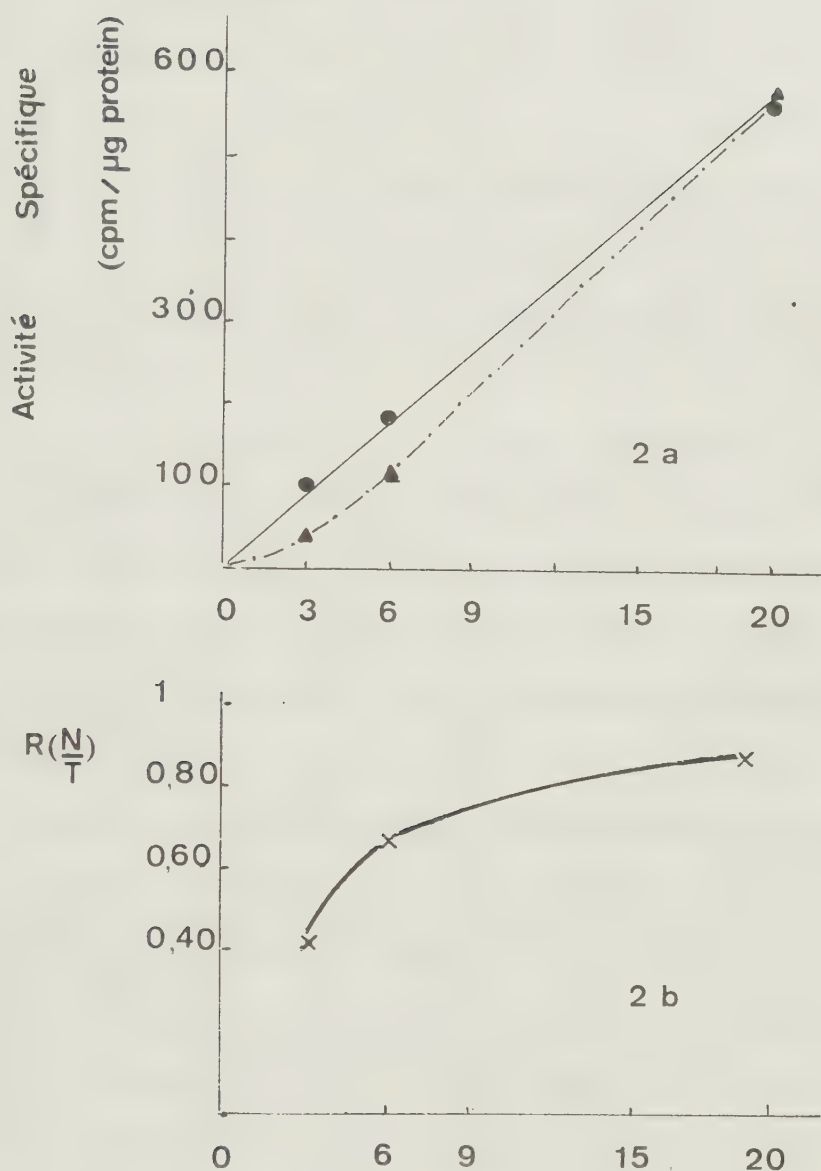


Fig. 2 : CINETIQUE DE MARQUAGE IN VITRO DES PROTEINES .

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont mises en culture dans le milieu minimum essentiel de EAGLE . Avant marquage par addition de L-leucine (^3H), à $10 \mu\text{C}/\text{ml}$, la suspension cellulaire est concentrée à environ 5×10^6 cellules/ml. Des parties aliquotes de la suspension cellulaire sont prélevées aux temps indiqués et les activités spécifiques mesurées pour les protéines cellulaires totales (—) et pour les protéines nucléolaires (— · — · —) , fig. 2a . Les variations du rapport $R = \frac{N}{T}$ sont montrées fig. 1b.

En réalisant ainsi une "chasse" de la radioactivité incorporée, on peut suivre le devenir des protéines synthétisées pendant la période de marquage. En fait, l'efficacité de la "chasse" par l'arrêt rapide de l'incorporation, ne dépend pas seulement du facteur de dilution du précurseur radioactif dans le milieu.

Nous avons pu observer que l'entrée d'un acide aminé dans les cellules d'hépatome ascitique) croît avec la concentration de cet acide aminé dans le milieu extra-cellulaire. Les acides aminés venant du milieu extra-cellulaire sont dilués dans les pools intracellulaires. Tant que l'entrée d'acide aminé externe reste faible devant les pools internes, la dilution isotopique effectivement obtenue au niveau des pools intracellulaires est très inférieure à celle qui est réalisée dans le milieu extra-cellulaire. Pour obtenir une dilution isotopique intracellulaire suffisante à la réalisation d'une véritable "chasse", nous avons dû porter la concentration en L-leucine froide du milieu de culture à 4mM (soit 10 fois la concentration du milieu complet normal), ce qui correspond à une dilution isotopique de L-leucine (^3H) de 1/12 000 dans le milieu extra-cellulaire. Dans ces conditions, le taux d'incorporation de radioactivité (en cpm/ μg de protéine/mn de marquage) est réduit à environ 2 % de la valeur mesurée avant l'addition d'acide aminé non marqué.

Mode opératoire.

Les cellules d'hépatome ascitique de rat sont prélevées de sur l'animal et mises en culture dans le milieu minimum essentiel d'Eagle dans les conditions décrites plus haut. Après 5 à 6 heures d'incubation à 37°C, la suspension cellulaire est concentrée par décantation et les cellules sont remises en suspension dans le milieu d'Eagle ne contenant que 1/50e de la concentration normale en L-leucine. Les cellules sont marquées, 30 minutes après le changement de milieu, par addition de L-leucine (^3H) (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Après 5 minutes de marquage, l'incorporation est arrêtée par addition à la suspension cellulaire d'un volume égal de milieu complet d'Eagle, préchauffé à 37°C et contenant 20 fois la concentration normale en L-leucine froide. Une partie aliquote de la suspension est pré-

Tableau I : VARIATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DES PROTEINES
DE DIFFERENTES FRACTIONS SUBCELLULAIRES AU COURS
D'UNE "CHASSE" DU MARQUAGE.

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées in vitro pendant 5 mn, par incorporation de L-leucine (^3H), à 10 $\mu\text{C}/\text{ml}$. L'incorporation de radioactivité est arrêtée par addition à la suspension cellulaire d'un volume égal de milieu à 37°C, contenant 20 fois la concentration normale en L-leucine soit 8 mM. Une première prise de suspension est prélevée après 1 mn (temps zéro de la "chasse"). D'autres prises sont effectuées 10 et 20 mn après la première.

a) Activité Spécifique incorporée dans les différents éléments sub-cellulaires (cpm/ μg de protéines)

DUREE DE LA CHASSE (mn)	CELLULE ENTIERE	NOYAU	NUCLEOLE	RNP _s NUCLEOL.
0	34	16	13,5	11
10	36	25	30	40
20	37	25	40	70

b) Rapport d'activité spécifique entre les protéines nucléaires et les protéines cellulaires totales .

DUREE DE LA CHASSE (mn)	NOYAU	NUCLEOLE	RNP _s NUCLEOL.
0	0,47	0,32	0,33
10	0,70	0,83	1,11
20	0,69	1,08	1,89

levée 1 minute après cette addition de milieu; elle correspond au temps zéro de la chasse. Les prélèvements suivants sont effectués 10 et 20 minutes après le premier. Les radioactivités spécifiques des protéines sont mesurées comme décrit précédemment, soit sur les cellules entières, soit sur les nucléoles, isolés selon la méthode par sonication à basse force ionique, décrite dans le chapitre I

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1. On constate que la radioactivité spécifique des protéines cellulaires totales n'augmente pratiquement pas au cours de la période de chasse (moins de 10 % en 20 minutes). Par contre, la radioactivité spécifique des protéines nucléolaires augmente considérablement : elle est multipliée par 3 sur le même intervalle de temps. L'activité spécifique des protéines nucléaires augmente elle aussi, mais dans des proportions moindres. Elle semble avoir atteint un palier après 10 minutes de chasse, alors que la croissance observée pour les protéines nucléolaires se poursuit encore après 10 minutes de chasse.

Le retard relatif du marquage des protéines nucléolaires pourrait cependant correspondre à un retard dans la pénétration de L-leucine (^3H) jusqu'à d'éventuels sites intranucléolaires de synthèse protéique. Un contrôle direct de cette possibilité n'apparaît pas actuellement possible expérimentalement. Néanmoins, dans cette hypothèse, il faudrait admettre que le temps d'équilibration en précurseur radioactif du pool intranucléolaire de L-leucine libre, dépasse de plus de 10 minutes celui des pools cytoplasmiques, puisque, au cours de l'expérience de "chasse", la radioactivité spécifique des protéines nucléolaires continue à croître 10 minutes après le début de la "chasse" (voir tableau 1).

Conclusion.

Les résultats de l'étude cinétique du marquage des protéines nucléolaires, effectuée dans des conditions différentes, sont convergents : ils sont tout à fait compatibles avec l'hypothèse d'une synthèse extra-nucléolaire -rapidement suivie d'un transfert dans le nucléole- pour la majeure partie des protéines rapidement marquées localisées dans le nucléole.

Ces résultats expérimentaux sont en accord avec ceux de SPEER et ZIMMERMANN (1968) qui avaient mis en évidence, chez les cellules Hela, un transfert dans le noyau de protéines nouvellement synthétisées dans le cytoplasme. Ils ont été confirmés, sur un matériel cellulaire différent, par les travaux de KAWASHIMA et al. (1971) qui ont effectué, sur des cellules d'ascite de souris, une étude cinétique comparable à la nôtre.

3. EFFET D'UN BLOCAGE DE LA BIOSYNTHESE DE L'ARN SUR LE MARQUAGE DES PROTEINES.

Les cellules d'hépatome ascitique en culture in vitro sont traitées par l'actinomycine D à une concentration inhibant pratiquement toute synthèse d'ARN (5 µg/ml) 25 minutes avant le marquage par addition de la L-leucine (^3H). Des parties aliquotes de la suspension cellulaire sont prélevées pour des temps de marquage croissants et les radioactivités spécifiques des protéines nucléolaires et cellulaires totales sont déterminées dans les conditions décrites plus haut.

Pour les périodes courtes étudiées, le prétraitement par l'actinomycine D ne provoque pas de modification sensible du taux de marquage des protéines cellulaires totales. Par contre, le marquage des protéines nucléolaires est nettement réduit et cela d'autant plus que la durée de marquage est plus longue. Les variations du rapport de radioactivité spécifique entre protéines nucléolaires et protéines cellulaires totales sont montrées, pour des cellules traitées par l'actinomycine D ou des cellules non traitées, en fonction du temps de marquage (fig. 3).

Ce résultat semble confirmer que le retard relatif du marquage des protéines nucléolaires (par rapport à l'ensemble des protéines cellulaires), qui peut être observé en l'absence de traitement par l'antibiotique, n'est pas simplement dû à un retard de pénétration dans le nucléole de l'acide aminé radioactif, mais qu'il correspond probablement à un transfert intranucléolaire de protéines nouvellement synthétisées.

Discussion :

HEADY et Mc CONKEY (1970), puis CRAIG et PERRY (1971) ont montré que des polyribosomes cytoplasmiques, capables de terminer dans un système cellulaire des polypeptides naissants, peuvent synthétiser des protéines de type ribosomique. La synthèse acellulaire de ces protéines n'est pas sensiblement affectée par la présence d'actinomycine D. D'autres auteurs

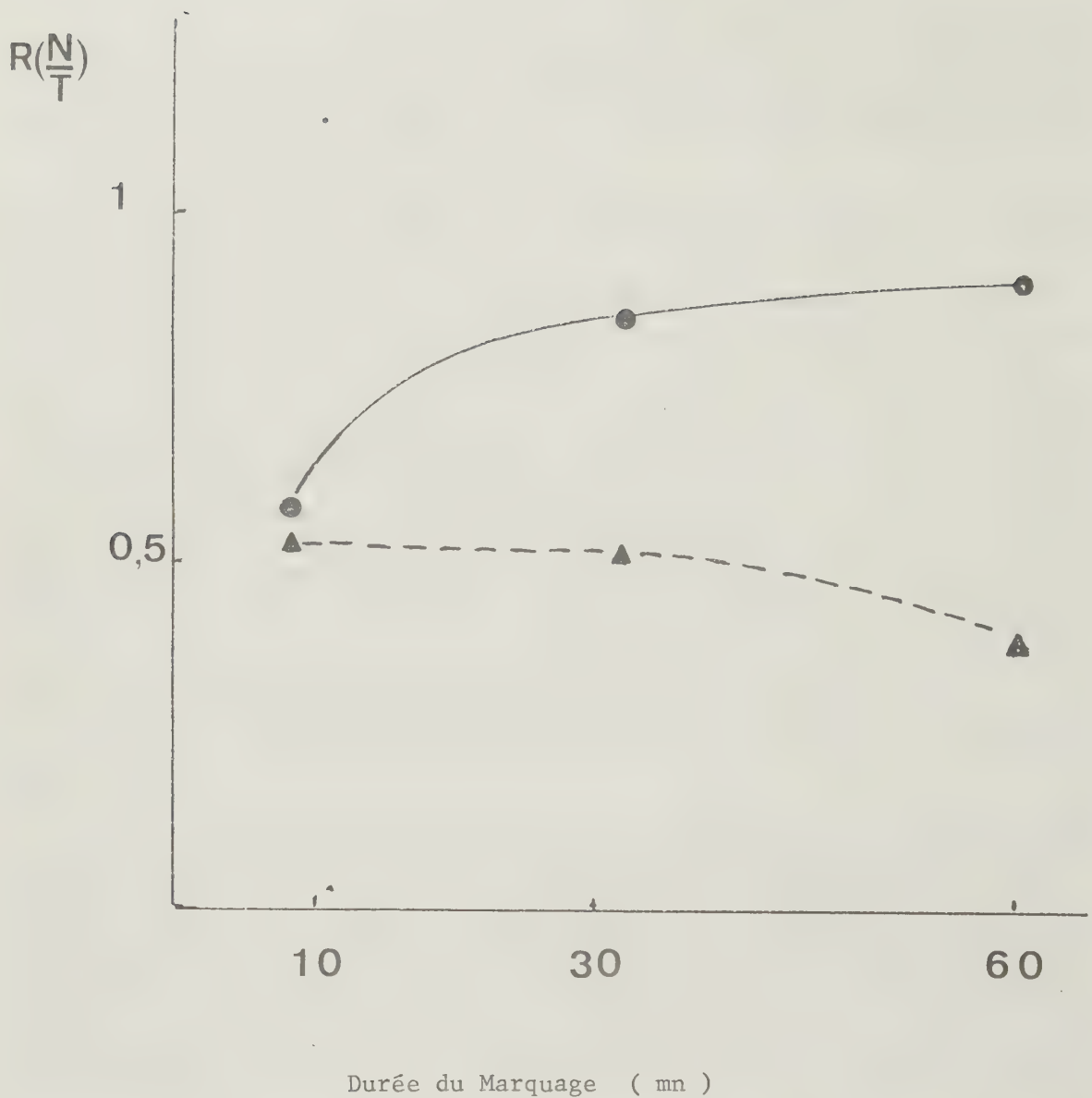


Fig. 3 : EFFET DU TRAITEMENT PAR L'ACTINOMYCINE D SUR LE MARQUAGE DES PROTEINES NUCLEOLAIRES.

Les cellules d'hépatome ascitique en culture in vitro dans le milieu minimum essentiel de EAGLE sont traitées par l'actinomycine D (5 $\mu\text{g/ml}$) 25 minutes avant le marquage par addition de L-leucine (^3H), à 2 $\mu\text{C/ml}$.

Les variations du rapport $R = \frac{Nu}{T}$ sont déterminées pour les cellules traitées ($-\triangle--$) et pour des cellules-témoins ($-\bullet--$).

(WARNER -1967- ; MADEN et VAUGHAN -1968-) ont signalé que des protéines de type ribosomique peuvent être détectées au niveau de nucléoles isolés. Par ailleurs, MAIZEL et Mc CONKEY (1970) ont observé que ces protéines de type ribosomique disparaissent du nucléole après un traitement des cellules par l'actinomycine D. Il se peut donc que l'apparition dans le nucléole de protéines de type ribosomique requière une synthèse continue d'ARN dans le nucléole.

L'ensemble des résultats qui viennent d'être décrits ou rappelés, permet de proposer le schéma suivant pour les phases précoces de l'élaboration du ribosome :

1. les protéines ribosomiques sont synthétisées dans le cytoplasme par le système polysomique classique puis, par simple diffusion intracellulaire ou par un mécanisme de transport actif, se localisent dans le nucléole;
2. au niveau du nucléole, ces protéines ribosomiques nouvellement synthétisées se fixent sur l'ARN préribosomique en cours de synthèse ou de maturation. En l'absence de synthèse d'ARN préribosomique, ces protéines ne peuvent plus être intégrées dans des RNPs. Le transfert vers le nucléole pourrait être régulé en fonction de la concentration intranucléolaire de ces protéines libres.

4. REPARTITION DES PROTEINES NUCLEOLAIRES NOUVELLEMENT SYNTHETISEES.

La dissociation partielle de l'appareil nucléolaire, obtenue par action de l'héparine sur les nucléoles isolés, permet de libérer, dans nos conditions expérimentales, la presque totalité de l'ARN et des protéines nucléolaires nouvellement synthétisées. L'étude cinétique du marquage des protéines nucléolaires a été effectuée sur les éléments subnucléolaires extraits et analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose.

Nous avons pu montrer que, d'une façon globale, les protéines nucléolaires qui ne sont pas retrouvées liées à l'ARN préribosomique se marquent plus rapidement que les protéines intégrées dans les RNPs préribosomiques. D'autre part, un blocage de la biosynthèse d'ARN préribosomique entraîne une réduction nette de la quantité de protéines nouvellement synthétisées retrouvées au niveau des RNPs préribosomiques.

Mode opératoire.

Les cellules d'hépatome ascitique en culture *in vitro* sont marquées par incorporation de L-leucine (^3H) pendant, 3, 6 ou 20 minutes. Les nucléoles sont isolés des cellules marquées. Les éléments extraits du nucléole par le traitement à l'héparine (surnageant 25 000 g) sont analysés par ultracentrifugation (2 heures à 42 000 t/mn, rotor Spinco SW 50) sur un gradient linéaire de saccharose 15-30 % dans le tampon TMK. La radioactivité incorporée est mesurée sur des fractions du gradient comme décrit précédemment.

Les résultats (fig. 4 a) montrent que la répartition entre les éléments subnucléolaires des protéines marquées ne reste pas le même quand le temps de marquage varie. Après 3 minutes d'incorporation, les RNPs de la zone 50-110S sont déjà notablement marqués. Cependant, la majeure partie des protéines nucléolaires marquées est retrouvée dans les dernières fractions du gradient, correspondant à des vitesses de sédimentation inférieures à 20S. Ces fractions ne contiennent pas d'ARN en quantité significative.. Les protéines retrouvées dans ces fractions peuvent être sous forme de molécules libres, d'associations protéiques intermoléculaires simples ou bien complexées à des fragments d'ADN incomplètement hydrolysés au cours de l'isolement des éléments sunucléolaires. Quand le temps de marquage augmente, la part de radioactivité incorporée dans des protéines qui est retrouvée au niveau des RNPs de la zone 50-110S augmente nettement. La courbe de la fig. 4 b. montre les variations du rapport de radioactivité incorporée entre les éléments de la zone 50-110S et ceux sédimentant à moins de 20S. Ce rapport passe du simple au double entre 3 et 20 minutes d'incorporation de L-leucine (^3H).

Un résultat tout à fait similaire a été obtenu au cours d'une "chasse" après une courte incorporation de L-leucine (^3H), dans les conditions décrites plus haut (p. 8). Après 5 minutes d'incorporation de l'acide aminé marqué, le marquage est arrêté par dilution isotopique par addition d'acide aminé non marqué et l'incubation est poursuivie pendant 20 minutes.

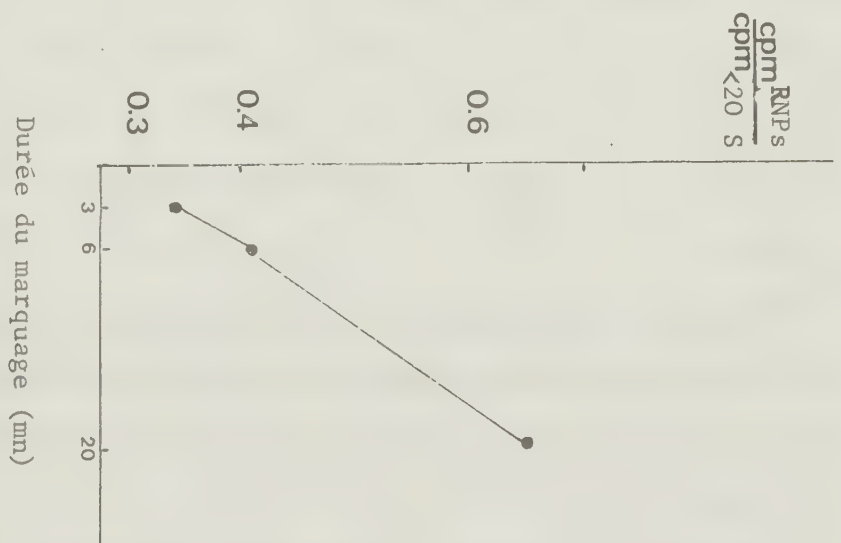
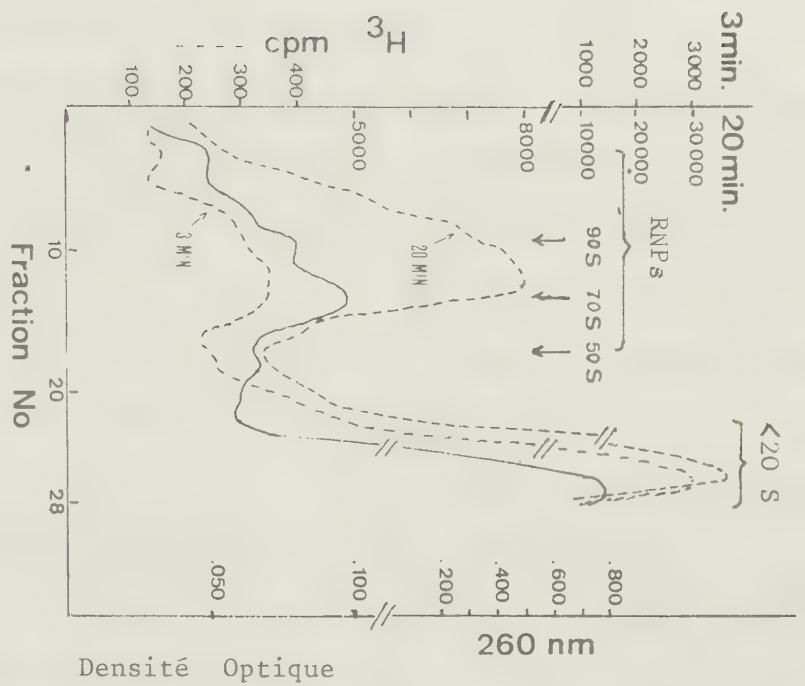


Fig. 4 : MARQUAGE DES PROTEINES DES FRACTIONS SUBNUCLEOLAIRES .

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique du rat, marquées par incorporation de L-leucine (^3H), à $10 \mu\text{C}/\text{ml}$. Les éléments subnucléolaires extraits après traitement par l'héparine des nucléoles isolés sont analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose (15-30%), dans le tampon TMK, dans les conditions décrites fig. 4.

- Profil de radioactivité incorporée en protéines après analyse sur gradient.
- Variations du rapport de radioactivité incorporée entre les zones "RNPs" et la zone "<20 S".

Des parties aliquotes de suspension cellulaire sont prélevées au début de la "chasse" puis 10 et 20 minutes après le début de la "chasse". Les éléments extraits des nucléoles isolés sont analysés dans les mêmes conditions que précédemment. L'évolution du rapport de marquage entre les deux types de fractions subnucléolaires est décrite Tab. 1b. Elle confirme les résultats précédents, avec plus de netteté encore du fait même de la "chasse".

Pour les deux classes de protéines considérées, l'activité spécifique continue à croître au cours de la chasse : elle passe respectivement de 1 à 7 pour les protéines de la zone 50-110S et de 3 à 6 pour les protéines sédimentant à moins de 20S.

Il semble donc que les protéines nouvellement synthétisées qui sont transférées dans le nucléole sont retrouvées à la fois dans les deux classes d'éléments subnucléolaires.

Cependant, la variation de la répartition des protéines marquées entre ces deux fractions peut correspondre soit à des classes de protéines différentes, à turn-over et vitesse de transfert différentes, soit à un passage de protéines nouvellement synthétisées de la fraction sédimentant à moins de 20S aux fractions 50-110S. L'analyse du spectre protéique de ces deux fractions, effectuée par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS, n'a pu apporter de réponse décisive sur ce point. En effet, si un nombre élevé d'espèces protéiques ne sont pas présentes dans l'une ou l'autre de ces fractions, un certain nombre de bandes homologues peut être détecté. Une étude comparative de l'évolution de la radioactivité spécifique de ces espèces homologues, retrouvées au niveau de la fraction dite "protéines libres" ($< 20S$) et au niveau des RNPs, peut permettre de mettre en évidence une éventuelle relation de précurseur à produit entre ces deux populations. Cette étude cinétique n'a cependant pu être encore effectuée pour des raisons techniques : sur des temps courts de marquage; les radioactivités spécifiques obtenues restent trop faibles pour permettre une étude suffisamment précise.

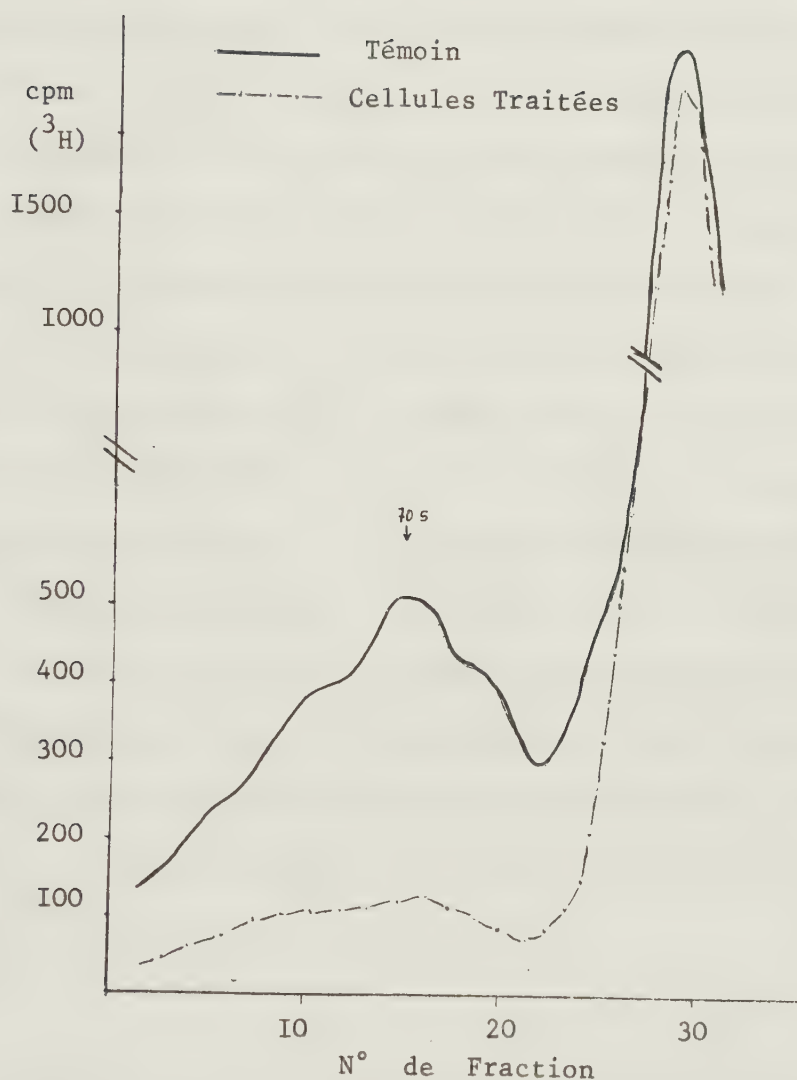


Fig. 5 : EFFET D'UN TRAITEMENT PAR L'ACTINOMYCINE D SUR LE MARQUAGE DES PROTEINES DES ELEMENTS SUBNUCLEOLAIRES .

Les cellules d'hépatome ascitique du rat en culture in vitro sont traitées par l'actinomycine D ($5 \mu\text{g/ml}$) pendant 25 minutes avant d'être marquées pendant 20 minutes par addition de L-leucine (^3H) . L'analyse des éléments subnucléolaires est effectuée dans les conditions décrites fig.4.

5. DEVENIR DES PROTEINES NUCLEOLAIRES NOUVELLEMENT SYNTHETISEES EN L'ABSENCE DE SYNTHESE D'ARN NUCLEOLAIRE.

L'inhibition de la biosynthèse d'ARN par les cellules d'hépatome est obtenu comme précédemment par action de l'actinomycine D (5 µg/ml). Après 20 minutes de traitement par l'antibiotique, les cellules sont marquées pendant 20 minutes par addition de L-leucine (^3H). Les éléments subnucléolaires sont extraits des nucléoles isolés, comme décrit précédemment, puis analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose. Les profils de radioactivité incorporée et de densité optique à 260 nm sont déterminés. Le résultat est décrit fig. 5. On constate que le profil en densité optique est peu modifié au niveau des RNPs. Par contre, la part de radioactivité incorporée en protéines qui est retrouvée au niveau de ces RNPs est nettement plus faible que dans le cas de cellules non-traitées. D'autre part, la radioactivité spécifique des protéines des fractions sédimentant lentement reste inchangée. Nous avons observé précédemment que le transfert vers le nucléole des protéines nouvellement synthétisées est réduit lors d'un arrêt de la biosynthèse d'ARN nucléolaire.

Il semble donc que l'inhibition du transfert dans le nucléole concerne une classe de protéines qui se lient rapidement à l'ARN préribosomique dans les premiers étapes de sa maturation à l'intérieur du nucléole.

CONCLUSION :

Les cinétiques de marquages des protéines nucléolaires semblent indiquer un transfert intranucléolaire de protéines nouvellement synthétisées à l'intérieur du nucléole. Ce transfert semble concerner les diverses classes de protéines nucléolaires, telles qu'elles peuvent être séparées après dissociation partielle de l'appareil nucléolaire.

Le marquage des protéines liées aux préribosomes de type 80 et 55S (obtenus en présence d'EDTA) s'effectue avec un court temps de latence par rapport à celui d'autres protéines nucléolaires. Cela peut correspondre à l'existence d'un "pool" plus important de protéines préribosomiques libres dans le nucléole.

Le marquage des protéines liées aux préribosomes est fortement réduit peu après un arrêt de la biosynthèse d'ARN nucléolaire. Il semble donc que la majeure partie de ces protéines se fixent, peu après leur synthèse, sur l'ARN préribosomique dès les premières étapes de la maturation intranucléolaire ribosomique.

La majeure partie des résultats qui viennent d'être exposés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication (BACHELLERIE et al. 1972).

DEUXIEME

PARTIE

INTRODUCTION

Le système chromatinien spécialisé que constitue le nucléole s'organise de façon précise du point de vue spatial et temporel, en relation étroite avec son activité fonctionnelle.

Parallèlement à l'étude des étapes fonctionnelles de la maturation préribosomique, nous avons entrepris de définir plusieurs approches expérimentales pouvant permettre d'approfondir l'étude de l'organisation fine de l'ensemble du système.

Divers travaux de microscopie électronique ont permis de préciser au niveau ultra-structural, l'organisation de nucléoles. C'est par la mise en oeuvre de différentes techniques de cytochimie ultrastructurales -colorations différentielles des éléments contenant l'ARN et l'ADN, traitements enzymatiques des coupes - que plusieurs types d'éléments subnucléolaires ont pu être identifiés et que leur situation topographique dans l'appareil nucléolaire a été mise en évidence (BERNHARD -1966-).

Le "corps nucléolaire" est entouré, de façon plus ou moins continue, d'une coque de chromatine associée dite chromatine périnucléolaire, qui possède une structure condensée, de type hétéro-chromatine. Cette chromatine se prolonge, à l'intérieur "du corps nucléolaire" par des invaginations plus ou moins importantes (chromatine intra-nucléolaire) dont l'abondance semble reliée à l'état physiologique de la cellule (GRANBOULAN et GRANBOULAN -1964-). Le "corps nucléolaire" lui-même est constitué d'éléments RNP, qui sont inclus dans une matrice protéique diffuse. Deux types morphologiquement différents de RNPs peuvent être identifiés dans les nucléoles des cellules animales.

Les RNPs de type granulaire présentent des analogies avec les ribosomes cytoplasmiques, ils mesurent environ 150 Å de diamètre. Les RNPs de type fibrillaire mesurent environ 50 Å de diamètre et de 300 à 400 Å de longueur; l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé se localise préférentiellement à leur niveau avant d'apparaître dans les RNPs granulaires (GRANBOULAN et GRANBOULAN -1965-)

Les techniques d'autoradiographie à haute résolution, l'étude morphologique des perturbations du fonctionnement nucléolaire normal, ont permis d'observer, au niveau ultrastructural, certains événements métaboliques caractéristiques.

Il a été montré que divers agents physiques -notamment les températures supra-optimales (SIMARD et al.-1969- ; AMALRIC et al.-1969-)- ou chimiques (antibiotiques) peuvent induire au niveau du nucléole des altérations morphologiques spécifiques et corrélativement, des modifications des processus de biosynthèse des acides nucléiques et des protéines.

Ainsi, toute une série d'anti-métabolites, parmi lesquels l'actinomycine D, qui peuvent interagir avec l'ADN, perturbent la biosynthèse de l'ARN nucléolaire et provoquent corrélativement des altérations spécifiques de la structure nucléolaire (SIMARD et BERNHARD -1966-). Cette altération caractéristique appelée "ségrégation nucléolaire" correspond à une redistribution topographique de différents constituants morphologiques du nucléole : les RNPs de types fibrillaire et granulaire qui, normalement, sont dispersés dans le "corps nucléolaire" sans localisation préférentielle, se regroupent alors dans des zones distinctes, tandis que la chromatine intranucléolaire disparaît ou se rétracte. Nous avons nous-même pu observer que ce phénomène correspond en outre à une réduction importante du transfert intranucléolaire de protéines nouvellement synthétisées (BACHELLERIE et al. -1972-).

La ségrégation nucléolaire n'est pas une simple conséquence d'un arrêt de la biosynthèse de l'ARN 45S; elle correspond aussi à des modifications de l'organisation de la chromatine nucléolaire, probablement reliée -au moins en partie- aux interactions entre l'ADN et l'antibiotique.

L'utilisation de telles drogues, qui permettent de provoquer des modifications ultrastructurales fines et spécifiques au niveau de l'appareil nucléolaire, apparaît particulièrement intéressante pour préciser l'organisation d'ensemble du nucléole. Cependant, l'étude directe *in situ* ne peut fournir que des informations limitées sur les effets et les moyens d'action de ces antibiotiques et, par suite, sur le fonctionnement normal du système.

Pour approfondir jusqu'au stade moléculaire les corrélations entre une activité fonctionnelle et une organisation ultra-structurale caractéristiques, il importait de définir au préalable des moyens expérimentaux appropriés.

En premier lieu, nous avons entrepris de mettre au point et de caractériser un système expérimental pour permettre de relier de façon précise la complétion d'événements fonctionnels élémentaires à des modifications de l'organisation d'unités structurales. Nous avons défini un système d'incubation *in vitro* de nucléoles isolés au niveau desquels certaines fonctions nucléolaires caractéristiques peuvent prendre place. Son application pourra être étendue à l'étude de sous-structures nucléolaires isolées. Il peut permettre, par ailleurs, d'identifier et de caractériser, parmi les divers mécanismes qui contrôlent l'activité nucléolaire, ceux qui sont sous la dépendance de facteurs d'origine extra-nucléolaire.

D'autre part, nous avons pu mettre au point des moyens d'isolement sélectifs de différents constituants nucléolaires, définis du point de vue fonctionnel et/ou topographique et ultra-structural. Ainsi, les éléments prérribosomiques les plus maturés peuvent être préférentiellement extraits de l'appareil nucléolaire modérément dissocié. Nous pouvons également isoler une classe de protéines nucléolaires, non liées à des acides nucléiques, et à taux de renouvellement rapide, dont le rôle dans le fonctionnement nucléolaire pourra être précisé. Nous avons enfin abordé l'étude d'un procédé plus général de dissection physicochimique du nucléole isolé. Par une étude

corrélative ultra-structurale biochimique, nous avons pu montrer qu'il était possible d'obtenir une destructuration progressive de l'appareil nucléolaire contrôlée par le niveau de la concentration en ion Mg^{++} (BACHELLERIE et al. -1975- SIMARD et al. -1975-). La mise en oeuvre de ce système nous a permis d'isoler des éléments dont la situation topographique dans l'appareil nucléolaire est défini. Elle peut permettre ultérieurement de déterminer leur rôle précis dans l'activité nucléolaire et on peut envisager, en particulier une possible caractérisation des relations fonctionnelles entre chromatine péri-nucléolaire et chromatine intra-nucléolaire.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I

SYSTEME ACELLULAIRE

PERMETTANT UN FONCTIONNEMENT PARTIEL DE

NUCLEOLES ISOLEES

INTRODUCTION

Un système de fonctionnement acellulaire partiel de nucléoles isolés a été caractérisé de façon préliminaire, en vue de préciser ultérieurement, d'une part la nature des mécanismes de régulation et le rôle éventuel de facteurs d'origine extranucléolaire et d'autre part les relations entre la complétion d'étapes fonctionnelles définies et l'organisation ultrastructurale des éléments nucléolaires.

L'étude fine des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels exige des systèmes expérimentaux où puisse être mis en évidence le rôle individuel des divers facteurs spécifiques impliqués dans les transformations métaboliques de l'ARN. Dans cette voie, il a déjà été possible de définir et d'utiliser différents systèmes acellulaires de complexité variable au niveau desquels certaines réactions ou séries de réactions métaboliques peuvent avoir lieu in vitro.

Le fonctionnement partiel de nucléoles isolés peut constituer un outil expérimental particulièrement intéressant dans l'étude des correlations entre organisation structurale et activité fonctionnelle au niveau de ce système chromatinien spécialisé. De ce point de vue, en effet, le système nucléolaire présente l'avantage de pouvoir être isolé dans un état où l'organisation architecturale observée in situ est relativement bien préservée. De plus, du fait de sa spécialisation fonctionnelle, il constitue un ensemble intégré au niveau duquel la transcription et les modifications post-transcriptionnelles sous forme de RNPs de molécules d'ARN bien définies peuvent être reliées à l'organisation d'une chromatine contenant les gènes codant pour cet ARN.

L'étude préalable qui va être décrite ici avait pour objectif de préciser, d'une manière globale, quelles fonctions métaboliques caractéristiques du système nucléolaire in situ pouvaient être effectuées in vitro par les nucléoles que nous pouvons isoler, pour lesquels l'organisation structurale -et particulièrement celle de la chromatine nucléolaire-

apparaît relativement bien préservée. Les résultats que nous avons pu obtenir serviront ultérieurement de base à une étude plus fine qui est actuellement engagée, et qui impliquera l'utilisation concertée des divers moyens expérimentaux qui ont pu être définis dans les précédents chapitres (extraction et caractérisation biochimique et ultrastructurale des préribosomes nucléolaires) ou qui le seront dans les chapitres suivants (systèmes d'extraction différentielle d'éléments nucléolaires, système de dissection physico-chimique de l'appareil nucléolaire).

Dans cette étude préliminaire, trois étapes du fonctionnement nucléolaire *in vitro* ont été examinées : étape transcriptionnelle et transformations post-transcriptionnelles, précoces ou tardives, de l'ARN préribosomique :

- Les molécules d'ARN dont la synthèse a été initiée *in vivo* continuent à être synthétisées *in vitro*. Une réinitiation de la transcription ne semble pas pouvoir s'effectuer *in vitro*.

- Des activités nucléasiques, probablement impliquées *in vivo* dans la maturation de l'ARN préribosomique, se manifestent *in vitro* au niveau des nucléoles isolés. Leur effet sur l'ARN préribosomique dépend du degré de maturation.

- La libération d'éléments préribosomiques des structures nucléolaires au cours de l'incubation concerne principalement les formes les plus maturées. Ce phénomène peut être relié aux processus physiologiques qui contrôlent *in vivo* la sortie du nucléole des préribosomes.

I. - TRANSCRIPTION IN VITRO

Introduction

L'incorporation de ribonucléotides en ARN par des noyaux ou des nucléoles isolés, lors d'incubation dans des systèmes acellulaires, a été rapportée par de nombreux auteurs.

La nature ribosomique de l'ARN formé a pu être précisée par différentes méthodes, faisant appel soit à une détermination de la composition en bases des molécules produites (TAKAHASHI et al. 1963 - WIDNELL et TATA 1964, 1966 - POGO et al. 1967) soit à la mesure de la fréquence des plus proches voisins au niveau de leur séquence de bases (WIDNELL et TATA 1966), soit encore à l'étude de la répartition des nucléotides méthylés (en position 2'0 sur le ribose) le long des molécules (AL-ARIF et SPORN-1972). Enfin, REEDER et ROEDER (1972) ont pu montrer que l'ARN produit dans ces conditions pouvait s'hybrider avec de l'ADN isolé, de type ribosomique.

Plus récemment, GRUMMT et LINDIGKEIT (1973), sur des nucléoles isolés, et HADJIOLOV et MILCHEV (1974), sur des noyaux isolés, ont pu préciser les caractéristiques de cette synthèse in vitro, notamment en déterminant la longueur des chaînes d'ARN formées en présence de faibles doses d' α -amanitine de manière à inhiber l'ARN-polymérase de type B (KEDINGER et al. 1970).

La comparaison des divers résultats obtenus reste cependant difficile. En effet, les procédés employés pour isoler les noyaux ou les nucléoles sont généralement différents. Ces traitements peuvent affecter dans une large mesure les caractéristiques de ces organelles dans un système d'incorporation acellulaire, notamment par perte ou inactivation éventuelles de facteurs spécifiques. Par ailleurs, le taux d'incorporation et la nature des produits formés dépendent étroitement des conditions physico-chimiques utilisées lors de l'incubation.

Un milieu à force ionique élevée provoque dans des noyaux isolés une agrégation de la chromatine nucléaire - LAVAL et BOUTEILLE (1973). LINDIGKEIT et al. (1974) ont observé qu'une augmentation de la concentration saline entraîne l'enlèvement progressif de l'histone F1 de la chromatine et l'augmentation parallèle du taux de synthèse d'ARN in vitro par des noyaux isolés. Cet effet a été décelé pour des concentrations en sulfate d'ammonium supérieures à 0,1 M. Il semble indiquer que la décondensation de la chromatine qui est consécutive à l'enlèvement de l'histone F1 entraîne une activation, du point de vue transcriptionnel, de la matrice chromatinienne, mais dans des conditions non physiologiques. En conséquence, les conditions optimum, du point de vue de la concentration saline lors de l'incubation, sont à rechercher dans la zone 0-0,1 M. Des valeurs voisines de 50 mM semblent particulièrement favorables, d'après nos résultats et ceux d'autres auteurs - GRUMMT et al. (1973) HADJIOLOV et al. (1974) LINDIGKEIT et al. (1974). Par ailleurs, il faut considérer que les résultats observés peuvent correspondre à la superposition de plusieurs phénomènes : biosynthèse, maturation normale ou dégradation non physiologique des molécules d'ARN.

a) Cinétique d'incorporation en ARN :

L'étude de l'incorporation de précurseur marqué en ARN pendant des incubations courtes nous a permis de préciser certains aspects de l'étape transcriptionnelle au niveau de la chromatine nucléolaire, maintenue dans un appareil hautement structuré.

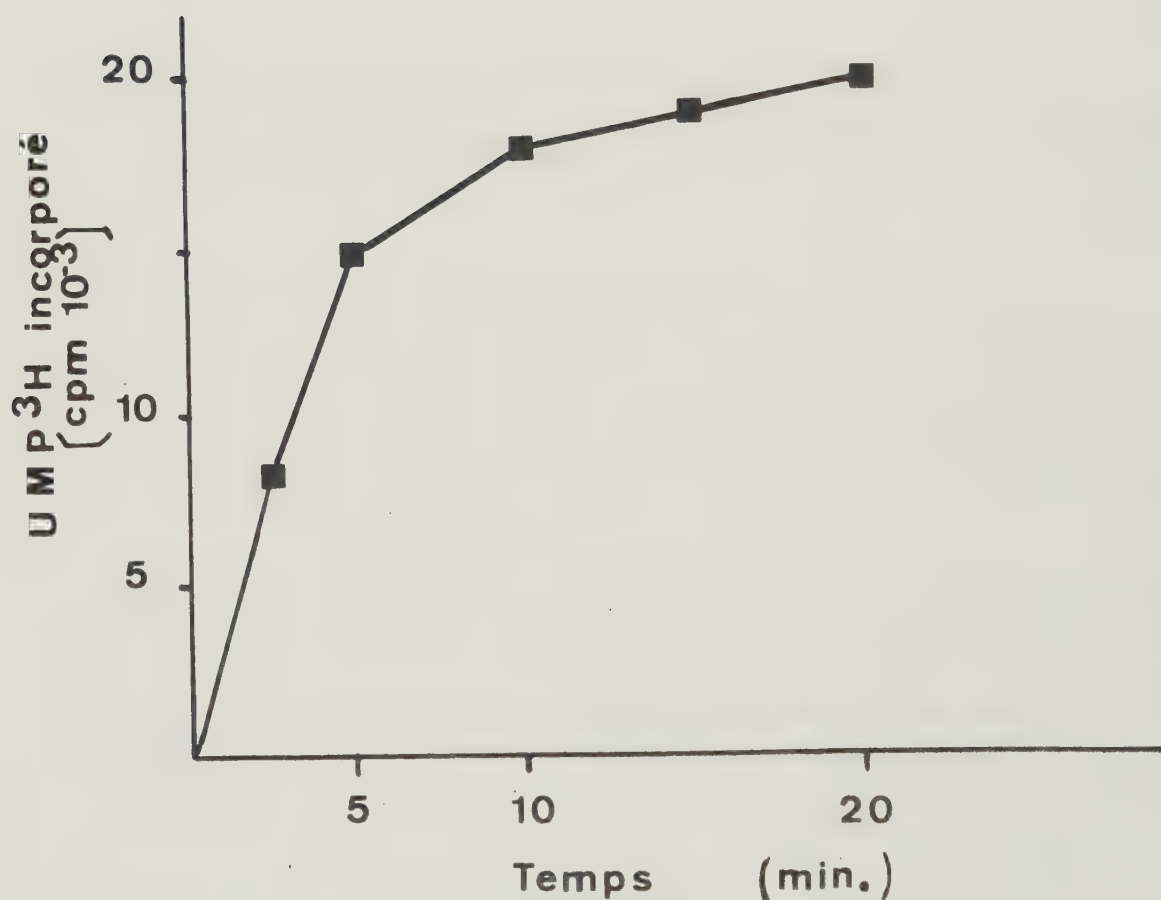


Fig.1 - Incubation "in vitro" de nucléoles isolés : Incorporation d'UMP ³H dans un milieu Tris-Mg²⁺ pH⁸ contenant les 4 ribonucléosides triphosphate et en présence d' α amanitine 0,2 μ g/ml afin d'inhiber l'activité ARN polymérasique B.

Mode opératoire :

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique par la méthode décrite dans le chapitre 1. La transcription *in vitro* est étudiée en mesurant l'incorporation d'un ribonucléotide marqué -UTP (^3H) - par des nucléoles remis en suspension dans le milieu suivant : Tris-HCl (0,1 M pH 8,5), MgCl_2 (5 mM), NaF (6 mM), β -Mercaptoéthanol (2 mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 mM) puis incubés penant des temps variables. Le milieu d'incubation que nous avons utilisé avait été défini par JACOB, SAJDEL et MUNRO (1969) pour tester l'activité d'ARN polymérase endogène dans des fractions nucléolaires. Le système contient également de l'ATP, du CTP, et du GTP (0,8 mM) ainsi que de l'UTP froid (0,1 mM). L'incubation est effectuée à 37°C en présence d' α -amanitine (1 $\mu\text{g/ml}$), de manière à inhiber l'activité RNA-polymérasique de type B qui reste présente au niveau des nucléoles isolés. L'UTP (^3H) est ajouté avant incubation. Pour l'expérience décrite fig. 1, 5 μCi d'UTP (^3H) sont ajoutés à chaque milieu d'incubation qui contient, dans 200 μl , environ 10^7 nucléoles. La dilution isotopique de l'UTP (^3H) par l'UTP froid est d'environ 80 fois. L'incorporation est arrêtée aux temps voulus en additionnant l'échantillon de 3 ml de TCA glacé (solution à 10%) contenant NaH_2PO_4 (0,04 M) et $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (0,025 M). Les précipités sont recueillis sur filtres en fibre de verre (Whatman GF/B) puis lavés au TCA à 5 %. Les filtres sont placés dans les flacons pour mesure de scintillation. Pour éviter toute absorption de radioactivité par le filtre, l'ARN est hydrolysé par traitement à l'ammoniaque (1 ml d'une solution à 10 % pendant 3 heures au minimum) avant mesure de la radioactivité en présence de 10 ml de mélange scintillant.

Les résultats obtenus sont décrits figure 1. On voit que l'incorporation d'UTP (^3H) en ARN croît linéairement pendant quelques minutes (5 à 7 minutes) puis atteint rapidement un palier. L'obtention rapide d'un palier d'incorporation n'est pas dû à l'épuisement du substrat, la proportion de radioactivité incorporée reste en effet très faible sur la période considérée (environ 0,1 %). De plus, si on ajoute au système, après obtention du palier d'incorporation, des nucléoles isolés non encore incubés, on observe une augmentation corrélative de l'incorporation en ARN.

Si on effectue, en l'absence de ribonucléotides triphosphates froids, une courte préincubation de la suspension de nucléoles isolés, l'incorporation qui peut être observée ultérieurement dans le système complet (avec ribonucléotides) est très semblable à celle décrite fig. 1. Par contre, si la préincubation est faite en présence de ribonucléotides triphosphates froids, l'incorporation ultérieure de radioactivité, après addition d'UTP (^3H), n'est plus possible.

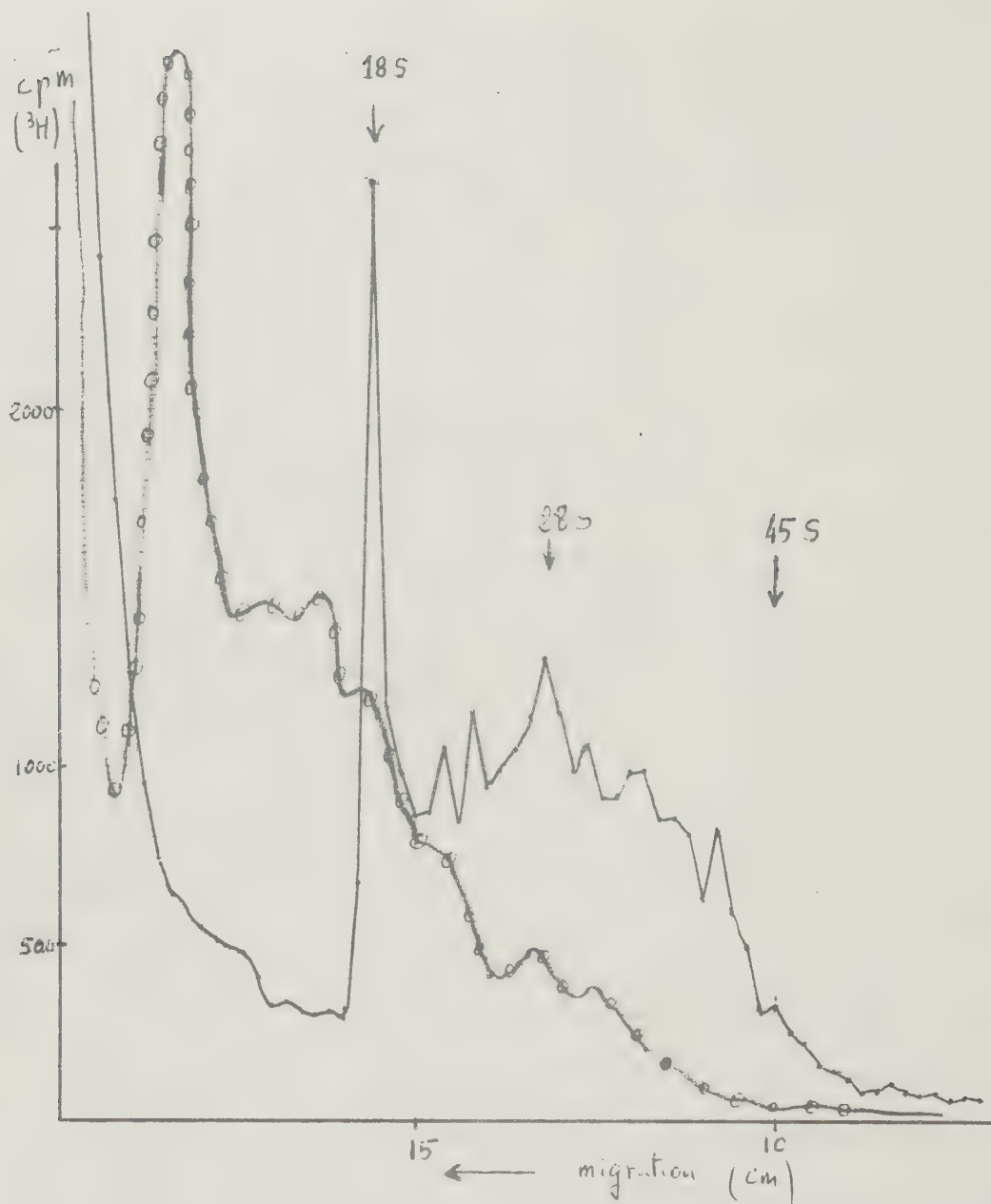


Figure 2 : Analyse électrophorétique de l'ARN nouvellement formé in vitro , en fonction de la durée de l'incubation :

- a) Incubation de 5 minutes.
- b) Incubation de 15 minutes.

L'ARN polymérase nucléolaire de type A est donc présente au niveau des nucléoles isolés; elle peut y effectuer l'élongation de chaînes d'ARN dont la transcription a été initiée in vivo mais elle ne peut initier in vitro la transcription de nouvelles chaînes.

Nous avons constaté que l'addition d'ADN exogène "nu" à la suspension nucléolaire après 20 minutes d'incubation in vitro - temps au bout duquel est atteint un palier d'incorporation par les nucléoles isolés - a pour résultat de permettre une incorporation nouvelle d'UTP marqué en ARN. Il ne semble donc pas que l'absence d'initiation au niveau des nucléoles isolés soit due à une simple inactivation de l'ARN-polymérase libre ou venant d'être libérée de l'ADN matrice en fin de transcription. Ce défaut d'initiation in vitro peut être dû soit à des modifications de la structure chromatinienne, soit à l'absence ou à l'inactivation de facteurs qui interviennent in vivo, soit sur l'ARN-polymérase, soit sur la chromatine à transcrire, pour assurer la spécificité de cette étape.

b) Analyse de l'ARN marqué in vitro :

L'incorporation est arrêtée aux temps voulus en plaçant le tube à hémolyse dans un mélange eau-glace à 4°C et en ajoutant immédiatement 2 ml de milieu d'extraction d'ARN nucléolaire (SDS 1 %, NaCl 0,14 M, CH₃COOK 0,05 M, pH 5,1 et PVS 20 µg/ml). L'ARN est extrait, après agitation en présence de phénol, dans les conditions précédemment décrites (chapitre 1) puis précipité par l'éthanol. L'ARN est ensuite analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose. Les résultats sont décrits fig. 2 pour des durées d'incubation de 5 et de 15 minutes. Après 5 minutes d'incorporation, la radioactivité est localisée au niveau d'ARNs de masse molaire relativement élevée, de répartition polydispersée entre 18 et 45S. Par contre, au bout de 15 minutes d'incubation, le marquage se retrouve intégré en majeure partie dans des molécules plus courtes, généralement inférieures à 18S. Le niveau de radioactivité incorporée après 15 minutes d'incubation n'étant que légèrement supérieur à celui atteint en 5 minutes, on peut en conclure

que ce déplacement net du marquage vers des ARNs à chaînes relativement courtes correspond à une hydrolyse. L'ARN marqué dans les premières minutes de l'incubation est ensuite rapidement dégradé par les ribonucléases nucléolaires. Cette explication sera confirmée par d'autres résultats expérimentaux exposés dans le paragraphe suivant.

c) Discussion et conclusion :

La transcription d'ADN nucléolaire en molécules d'ARN à haute masse molaire, peut se poursuivre in vitro au niveau du nucléole que nous isolons lorsqu'elle a été initiée in vivo. Par contre, l'étape d'initiation ne peut avoir lieu dans nos conditions expérimentales. Ce résultat est tout à fait en accord avec celui déjà décrit par GRUMMT et al. (1973) dans des conditions analogues. Par ailleurs, HADJIOLOV et al. (1974) ont constaté, au cours d'incubation de noyaux isolés, que cette étape fonctionnelle ne peut également avoir lieu au niveau de nucléoles encore relativement maintenus dans leur environnement nucléaire originel. Il se peut, en conséquence, que cette étape soit contrôlée par des facteurs d'origine cytoplasmique à renouvellement intranucléolaire rapide, que ne seraient donc plus disponibles dans ces conditions. Le système de fonctionnement in vitro des nucléoles isolés est particulièrement adapté pour tester cette hypothèse. Nous nous proposons d'examiner l'effet d'une addition d'éléments cytoplasmiques exogènes sur la biosynthèse et la maturation de l'ARN nucléolaire au cours de l'incubation du système.

En ce qui concerne la caractérisation des ARNs formés in vitro dans le nucléole, leur nature préribosomique n'est pas établie de manière rigoureuse. Des expériences d'hybridation moléculaire avec l'ADN nucléolaire en présence d'ARN ribosomique cytoplasmique utilisé comme compétiteur, seront effectuées pour répondre avec plus de certitude.

Les espèces moléculaires préribosomiques de taille discrète sont difficilement décelables : si la radioactivité incorporée est bien retrouvée dans des nucléoles à haute masse molaire, sa distribution en taille est polydispersée (approximativement entre 45S et 18S). En fait, nous avons pu constater (voir paragraphe précédent) que l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé est rapidement hydrolysé in vitro. Les profils de radioactivité incorporée en ARN (fig. 2) correspondent donc en réalité à la superposition d'une synthèse et d'une dégradation des chaînes synthétisées, même pour le temps d'incubation le plus court qui a été étudié (5 minutes). Il est donc tout à fait possible qu'il y ait in vitro synthèse d'un précurseur ribosomique de taille normale, mais qu'il soit difficilement décelable du fait de son instabilité dans ces conditions expérimentales.

Pour notre part, nous n'avons pas observé la formation de chaînes d'ARN de taille supérieure à 45S. GRUMMT et al. (1973) ont montré par contre qu'une synthèse in vitro de molécules de taille nettement supérieure (jusqu'à 85S) pouvait s'effectuer au niveau des nucléoles isolés. Le précurseur initial qui a pu être généralement détecté par marquage in vivo est de type 45S. Cependant, SHARMA et al. (1969), utilisant des conditions d'extraction très douces, ont signalé l'existence dans le nucléole de cellules

d'hépatome de rat, de molécules de taille supérieure. Des ARNs de 65 et 85S présentent des propriétés de précurseur de l'ARN 45S. Ces espèces moléculaires contiennent aussi en proportion importante des séquences non représentées dans la molécule de 45S. Il a été suggéré par ces auteurs que les ARNs 65 et 85S pouvaient représenter des sortes de dimères et trimères de l'ARN 45S et qu'ils constituent le produit d'une transcription en tandem de segments répétés d'ADN ribosomique. Cependant, cette hypothèse n'a pas trouvé de confirmation dans les résultats décrits par MILLER et al. (1972) qui ont pu visualiser le processus de transcription *in vivo* de gènes vraisemblablement ribosomiques : ces derniers auteurs n'ont pas détecté de segments transcrits de taille supérieure à celle qui correspond à l'ARN 45S. En définitive, on peut supposer que dans le système décrit par GRUMMT et al. (1973) l'arrêt normal de la transcription de la molécule d'ARN précurseur ne s'effectue pas *in vitro*, du fait de l'absence ou de l'inactivation de facteurs nécessaires. Cela ne semble pas être le cas dans nos conditions expérimentales.

Pour un développement ultérieur de cette voie expérimentale, il est indispensable de caractériser plus précisément la nature du produit de la transcription *in vitro*. Des expériences d'hybridation moléculaire de cet ARN avec l'ADN nucléolaire, en présence d'ARN ribosomique cytoplasmique utilisé comme éventuel compétiteur seront entreprises. Par ailleurs, l'isolement de cet ARN, dans des conditions physicochimiques ne dissociant pas les complexes spécifiques nucléolaires permettra de comparer les éléments formés *in vitro* aux préribosomes qui sont produits *in vivo* et de mieux préciser les mécanismes qui ont été mis en jeu.

2.- MATURATION IN VITRO

La biosynthèse des sous-unités ribosomiques chez les organismes supérieures implique une série de coupures de la molécule d'ARN précurseur. Ces réactions de clivage qui ont lieu dans le nucléole supposent un degré élevé de spécificité. En vue de préciser comment s'effectue la reconnaissance des sites bien définis sur la molécule d'ARN 45 S et comment les produits formés dans la réaction d'hydrolyse spécifique sont protégés d'une dégradation plus poussée, des nucléoles isolés capables d'effectuer ces transformations in vitro peuvent constituer un système expérimental particulièrement intéressant. Différents auteurs

LIAU et al. (1968) MIRAULT et al. (1972) ont rapporté que l'ARN nucléolaire pouvait être hydrolysé, de façon relativement spécifique, au cours d'incubation de nucléoles isolés. Pour notre part, nous avons constaté que les activités nucléasiques nucléolaires détectables in vitro s'exerçaient de façon différentielle selon le degré de maturité de l'ARN nucléolaire.

Après marquage in vivo de l'ARN, les nucléoles sont isolés puis incubés in vitro dans le système qui vient d'être décrit. L'incorporation de radioactivité pendant l'incubation in vitro est nulle (les précurseurs radioactifs ont été éliminés au cours de l'isolement des nucléoles). Il est donc possible de suivre le devenir in vitro de l'ARN marqué in vivo sans que l'interprétation des résultats soit compliquée par une incorporation résiduelle persistante, comme c'est le cas dans les conditions de "chasse" généralement obtenues in vivo.

Les temps d'incubation qui ont été choisis correspondent à l'intervalle (moins de 20 minutes) dans lequel une synthèse d'ARN in vitro peut être observée. Le sort de l'ARN synthétisé in vivo a été étudié dans les conditions d'incubation qui permettent cette synthèse in vitro, c'est-à-dire en présence des 4 ribonucléosides triphosphates froides.

α) Devenir in vitro de l'ARN nucléolaire relativement peu mûré in vivo

Les cellules d'hépatome ascitique sont marquées pendant 30 minutes par incorporation d'uridine (^3H). Les nucléoles sont isolés selon

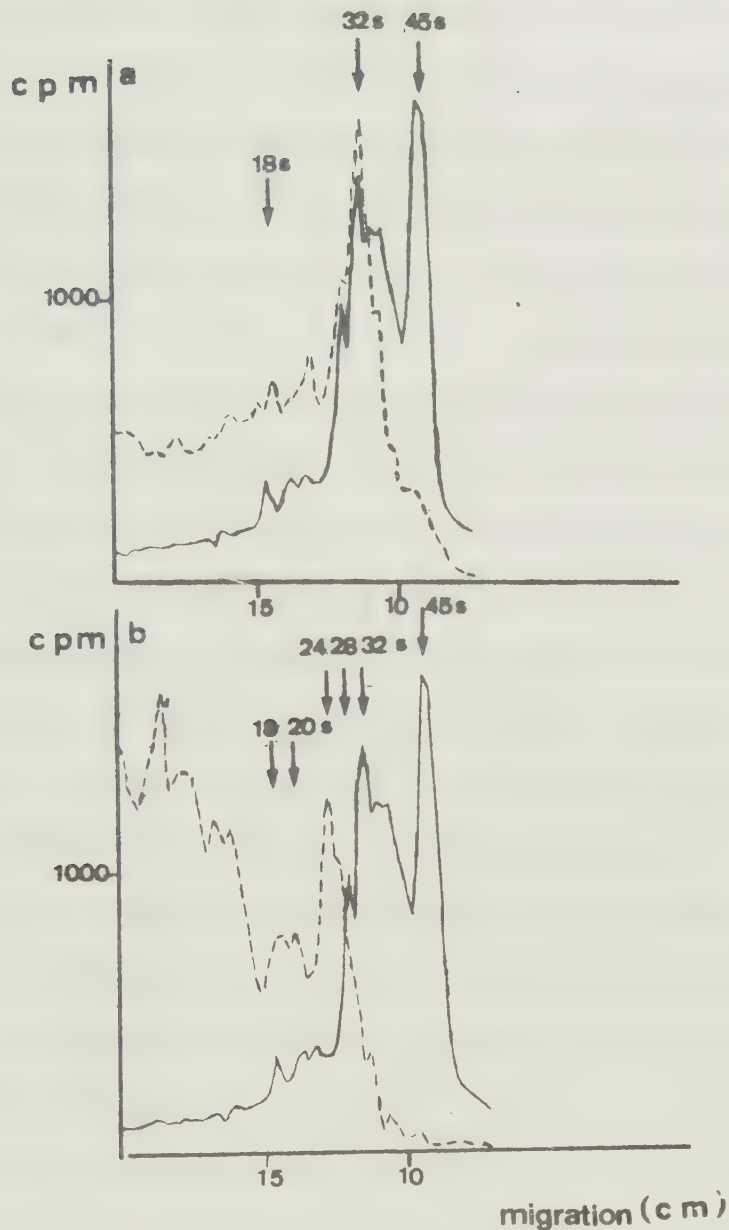


Fig.3

HYDROLYSE DE L'ARN NUCLEOLAIRE NOUVELLEMENT SYNTHETISE IN VIVO,
AU COURS DE L'INCUBATION IN VITRO DES NUCLEOLES ISOLES .

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique du rat après 30 minutes de marquage par incorporation d'uridine (^3H). Après incubation des nucléoles isolés, l'ARN est extrait puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose.

a) 5 minutes d'incubation ; b) 15 minutes d'incubation.

————— : ARN extrait des nucléoles avant l'incubation.

- - - - - : ARN extrait après incubation.

la technique précédemment décrite — ZALTA (1971) — après sonication des noyaux à basse force ionique, et remis en suspension dans le milieu d'incubation contenant les 4 ribonucléosides triphosphates non marqués. L'échantillon standard d'incubation généralement utilisé a un volume de 200 μ l et contient environ 10^7 nucléoles remis en suspension dans le milieu décrit précédemment.

L'ARN est extrait sur des parties aliquotes de la suspension nucléolaire, après 5 minutes et 15 minutes d'incubation, dans les conditions décrites plus haut. Les profils de radioactivité, obtenus après électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose, sont décrits fig. 3. Le profil de l'ARN nucléolaire marqué extrait d'une partie aliquote de la suspension nucléolaire avant incubation est montré également sur cette figure, à titre de contrôle.

Après 5 minutes d'incubation (fig. 3a), on peut déjà constater d'importantes modifications du profil en radioactivité de l'ARN nucléolaire, analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide. On observe d'une part la formation de molécules d'ARN de taille relativement courte (< 18 S) qui n'étaient présentes initialement qu'en faible proportion et qui proviennent donc du clivage in vitro de chaînes plus longues. Leur répartition est relativement polydispersée. Par ailleurs, la majeure partie de l'ARN 45 S qui avait été synthétisé in vivo a été transformé in vitro en molécules plus courtes.

L'hydrolyse in vitro concerne aussi les espèces moléculaires préribosomiques intermédiaires entre les formes 45 S et 32 S mais dans des proportions moindres que pour l'ARN 45 S. Par contre, la proportion d'ARN marqué retrouvé sous forme 32 S n'est pas sensiblement modifiée ;

cependant, une légère augmentation, si toutefois elle est significative, peut être observée. Enfin, les espèces d'ARNs préribosomiques de 18, 20 et 24 S qui étaient déjà décelables après le marquage *in vivo* deviennent nettement plus marquées après l'incubation.

Si l'incubation est poursuivie, l'hydrolyse *in vitro* est encore plus poussée. Au bout de 15 minutes (fig. 3), tout l'ARN 45 S synthétisé *in vivo* a disparu ; il en est pratiquement de même pour les autres espèces préribosomiques à haute masse molaire. Seule une faible proportion d'ARN 32 S reste présente. Un épaulement est également apparent au niveau de 28 S.

Corrélativement, on observe la formation de chaînes d'ARN à faible masse molaire, dans des proportions nettement plus importantes que dans le cas précédent (5 minutes d'incubation). Superposées à une distribution polydispersée, certaines espèces moléculaires de taille discrète sont décelables. Certaines ont des longueurs proches de celles d'ARNs préribosomiques (18, 20 et 24 S). D'autres ne correspondent pas à des formes intermédiaires normales de la maturation ribosomique (26 S notamment).

*Divers auteurs ont pu mettre en évidence, au niveau de nucléoles isolés, des activités de type endo et exo-nucléasique: LIAU, CRAIG et PERRY (1968), KELLEY et PERRY (1971), MIRAULT et SCHERRER (1972), WINICOV et PERRY (1974). Une endonucléase, isolée de nucléoles de cellules HeLa par MIRAULT et SCHERRER (1972), peut effectuer *in vitro* la maturation de l'ARN 45 S, intégré dans les préribosomes nucléolaires, jusqu'au stade 32 S et éventuellement aux stades 28 et 18 S. Son activité est fortement inhibée *in vitro* en présence d'ion Mn^{2+} .*

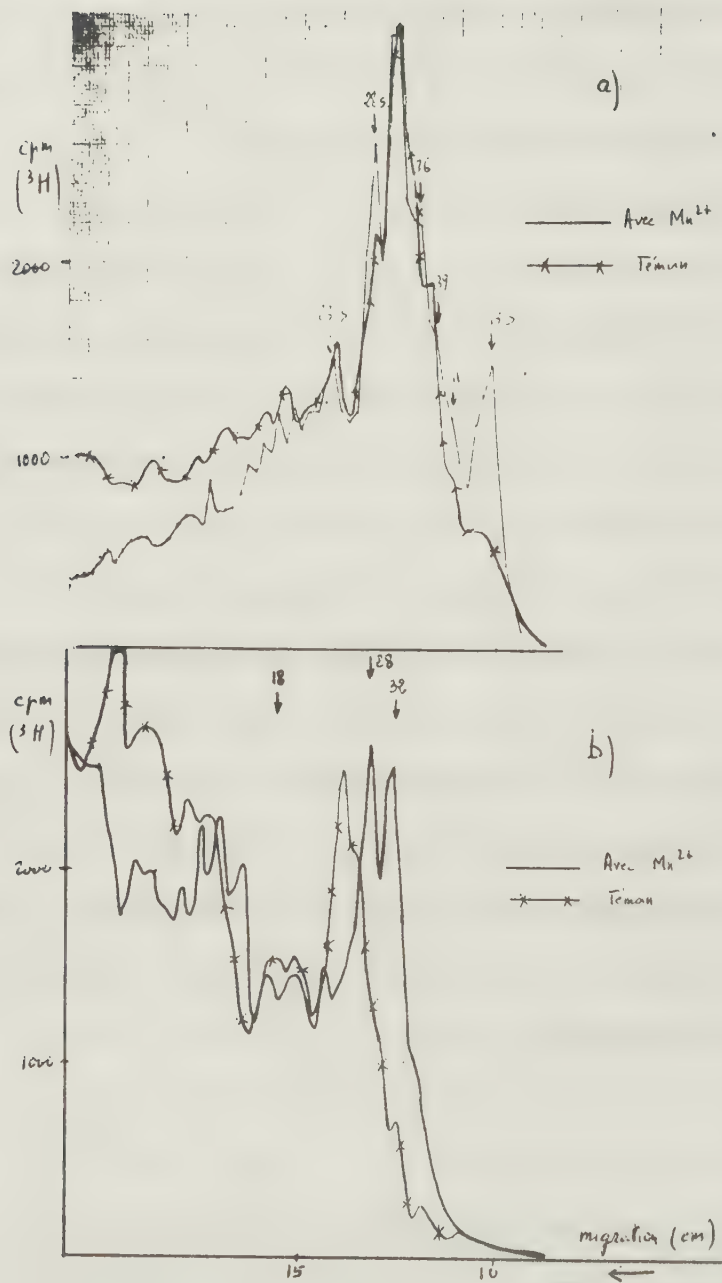


Figure 4 : Effet inhibiteur de l'ion Mn^{2+} sur l'hydrolyse in vitro de l'ARN nucléolaire durant l'incubation.

- a) Incubation de 5 minutes.
- b) Incubation de 15 minutes.

En vue de caractériser, de façon préliminaire, les activités nucléasiques responsables de l'hydrolyse de l'ARN nucléolaire peu mûré in vivo que nous avons pu observer in vitro, l'incubation des nucléoles isolés a été effectuée dans des conditions analogues à celles que nous avons décrites plus haut, mais en présence d'ion Mn^{2+} .

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique marquées par 30 minutes d'incorporation d'uridine (3H), comme précédemment. L'incubation des nucléoles isolés est effectuée dans les conditions décrites plus haut, en présence de ribonucléotides triphosphates non marqués, en présence ou en l'absence d'ion Mn^{2+} (4 mM). Après incubation, l'ARN nucléolaire est extrait et analysé par électrophorèse. Les profils de radioactivité obtenus après 5 minutes et 15 minutes d'incorporation sont montrés respectivement fig. 4a et fig. 4b. Le profil de marquage de l'ARN extrait des nucléoles non incubés n'est pas présenté ici pour éviter de surcharger les figures. Il est en fait exactement identique à celui de la fig. 3.

Pour les deux temps d'incubation étudiés, on constate que la présence d'ion Mn^{2+} a pour effet de réduire le taux d'hydrolyse des chaînes d'ARN formées in vivo : Après 5 minutes d'incubation en présence d'ion Mn^{2+} , on peut constater que la proportion d'ARN 45 S marqué in vivo qui est hydrolysé in vitro est nettement réduite si on la compare à ce qui est obtenu lors d'une incubation en l'absence de Mn^{2+} (fig. 4a).

Si l'incubation est effectuée pendant 15 minutes (fig. 4b), la totalité de l'ARN 45 S marqué est hydrolysé, même si l'ion Mn^{2+} est présent. Cependant, dans ce dernier cas, les ARNs formés in vitro restent de tailles sensiblement supérieures.

La présence d'ion Mn^{2+} semble donc ralentir le processus global d'hydrolyse in vitro mais sans le supprimer. Ce résultat peut indiquer la présence d'activités nucléasiques différentes au niveau des nucléoles que nous pouvons isoler. La présence d'activités de type exo-nucléasique semble probable de part la distribution en taille des fragments formés au cours de l'incubation.

b) Devenir, au cours de l'incubation in vitro, de l'ARN nucléolaire plus mûré in vivo.

Nous avons entrepris de déterminer si le processus d'hydrolyse in vitro de l'ARN nucléolaire pouvait avoir une certaine spécificité en fonction du degré de maturation in vivo de l'ARN sur lequel il s'exerce.

Des expériences analogues à celles qui viennent d'être décrites ont été effectuées en utilisant des nucléoles dont l'ARN avait été marqué in vivo pendant des périodes plus longues que dans le cas précédent.

Les cellules d'hépatome ascitique sont marquées pendant 18 heures par incorporation de phosphate marqué (^{32}P). Les nucléoles sont isolés et incubés in vitro en présence de ribonucléotides triphosphates froids comme précédemment. Les profils de radioactivité de l'ARN nucléolaire, extrait après l'incubation et analysé par électrophorèse, sont montrés fig. 5 pour les divers temps d'incubation étudiés, et comparés au profil de l'ARN nucléolaire extrait d'une partie aliquote de la suspension nucléolaire avant l'incubation.

On voit clairement que la transformation *in vitro* des chaînes d'ARN marqué est considérablement réduite ou ralentie par rapport à l'expérience décrite fig. 3. Même pour un temps d'incubation de 20 minutes, une fraction importante de l'ARN 45 S marqué n'est pas hydrolysée. La production de fragments relativement courts et de tailles polydispersées est faible. Il est intéressant de noter que la part de radioactivité retrouvée au niveau des ARNs de type ribosomique les plus maturés (28 et 18 S) augmente légèrement.

c) Discussion :

En conclusion, nous avons pu observer que les nucléoles isolés contenaient des éléments capables de catalyser in vitro l'hydrolyse des ARNs prérribosomiques. L'action nucléasique qui a pu être mise en évidence varie selon le degré de maturité de l'ARN nucléolaire.

L'ARN nucléolaire prérribosomique relativement peu mûré in vivo est très sensible à cette action. Son hydrolyse est extensive : elle conduit rapidement à l'apparition de chaînes d'ARN très courtes différentes des molécules détectables in vivo. Il semble cependant que des espèces moléculaires de taille proche de celles des ARNs intermédiaires de la maturation ribosomique naturelle puissent se former, de façon transitoire, dans ces conditions et qu'elles ne peuvent alors être stabilisées par les facteurs qui interviennent in vivo pour contrôler l'étendue de l'hydrolyse.

Par contre, les ARNs nucléolaires les plus mûrés in vivo (y compris l'ARN 45 S le plus "âgé") apparaissent nettement mieux protégés vis-à-vis de l'hydrolyse in vitro et les seules transformations observées in vitro correspondent essentiellement à la formation de chaînes d'ARN dont la taille est proche de celles d'intermédiaires naturels de la maturation ribosomique.

En définitive, il apparaît que dans le nucléole l'ARN prérribosomique relativement mûré subit in vitro sous forme de RNP une hydrolyse beaucoup plus spécifique que celle qui s'exerce sur l'ARN moins mûré. Cette conclusion doit être mise en parallèle avec les résultats de LIAU et al. (1968). Ces auteurs avaient ajouté, avant l'incubation du système de nucléoles isolés, différents types d'ARN prérribosomiques ou ribosomiques et avaient mesuré l'étendue de l'hydrolyse subie in vitro par ces ARNs exogènes "nus". Ils avaient pu

constater que l'ARN 45 S subit alors une hydrolyse importante et non spécifique, tandis que les ARNs 32, 28 ou 18 S sont très peu dégradés. Nous avons donc, en ce qui concerne les ARNs nucléolaires endogènes, mis en évidence un phénomène analogue.

Ces résultats indiquent que la spécificité des réactions d'hydrolyse *in vivo* au cours des phases précoces de la maturation intranucléolaire n'est pas seulement gouvernée par la structure de la molécule d'ARN précurseur. A cet égard, les protéines qui se lient *in vivo* à la molécule de précurseur peuvent jouer un rôle essentiel.

L'absence de certaines de ces protéines notamment de celles à ~~taux~~ de renouvellement rapide dans le nucléole dans le cas d'un fonctionnement acellulaire peut rendre compte de la sensibilité particulièrement élevée de l'ARN précurseur, qu'il soit exogène ou endogène.

3. EXPORTATION IN VITRO DES ARNs NUCLEOLAIRES.

Il est bien établi que les diverses transformations post-transcriptionnelles successives que subissent la plupart des ARNs ont lieu dans des sites intracellulaires différents. Les mécanismes qui contrôlent, du point de vue spatio-temporel, la localisation intracellulaire, sont probablement multiples et complexes. On peut envisager qu'une part, au moins, des informations nécessaires à ce contrôle sont contenues dans la structure même de la molécule de l'ARN précurseur; à cet égard, le rôle des séquences non-conservées au cours de la maturation peut être essentiel. Par ailleurs, les protéines qui se lient spécifiquement, de façon transitoire ou permanente, à la molécule de précurseur, doivent permettre également une modulation de la production du produit final fonctionnel.

In vivo, seules les RNPs préribosomiques qui contiennent l'ARN le plus mûr sont libérées du nucléole. Les RNPs insuffisamment mûres sont donc, par un mécanisme restant à préciser (vraisemblablement en relation avec leur état conformationnel et leur affinité pour des éléments de la trame nucléolaire), maintenus dans des structures et des sites nucléolaires d'où ils ne peuvent être exportés qu'après une transformation physicochimique (réaction terminale de maturation intranucléolaire).

Nous avons examiné s'il existait une relation entre la complétion in vitro des réactions de transformation des chaînes d'ARN préribosomique et l'exportation, hors des structures nucléolaires isolées, des produits de cette transformation.

Nous avons déterminé quelle fraction d'ARN nucléolaire est libérée des structures nucléolaires au cours de l'incubation in vitro dans les systèmes acellulaires. Cette mesure a été faite pour les deux classes d'ARN nucléolaires, caractérisées par leur sensibilité différente vis-à-vis des activités nucléasiques qui s'exercent in vitro : ARNs nucléolaires relativement peu mûrs in vivo — étudiés après marquage de 30 minutes par l'uridine (^3H) — et ARNs nucléolaires plus mûrs — marqués par plusieurs heures d'incorporation de PO_4 (^{32}P) —.

Les résultats exposés dans le tableau 1 indiquent que la libération d'ARN des structures nucléolaires n'est pas directement reliée à l'étendue de l'hydrolyse qui s'exerce in vitro. La sortie d'ARN ne semble pas facilitée par la production de fragments de taille de plus en plus réduite. Au contraire, on peut constater que l'ARN nucléolaire le plus mûr in vivo, c'est-à-

TABLEAU I :

Libération de l'ARN des structures nucléolaires durant l'incubation in vitro.

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique dont l'ARN a été marqué, soit par 30 minutes d'incorporation d'uridine (^3H), soit par 20 heures d'incorporation de phosphate (^{32}P).

L'incubation in vitro est effectuée pendant 15 minutes à 37°C , en présence des 4 ribonucléosides-triphosphate froids.

Après l'incubation, la suspension nucléolaire est ramenée immédiatement à 4°C , diluée par addition de 20 volumes de tampon TMK glacé, puis centrifugée 5 minutes à 1500g (les nucléoles se retrouvent dans le culot 1500g).

Le pourcentage d'ARN marqué qui se retrouve dans le surnageant 1500g est mesuré.

Des nucléoles témoins, remis en suspension, non incubés, dilués dans le tampon TMK et centrifugés dans les mêmes conditions, ne libèrent que 2% environ de l'ARN marqué dans le surnageant 1500g.

Durée du marquage in vivo	% de l'ARN nucléolaire marqué retrouvé dans S 1500g	
	Incubation Système Standard	Incubation en présence de Mn^{2+}
30 mn	40	4
18 h	85	14

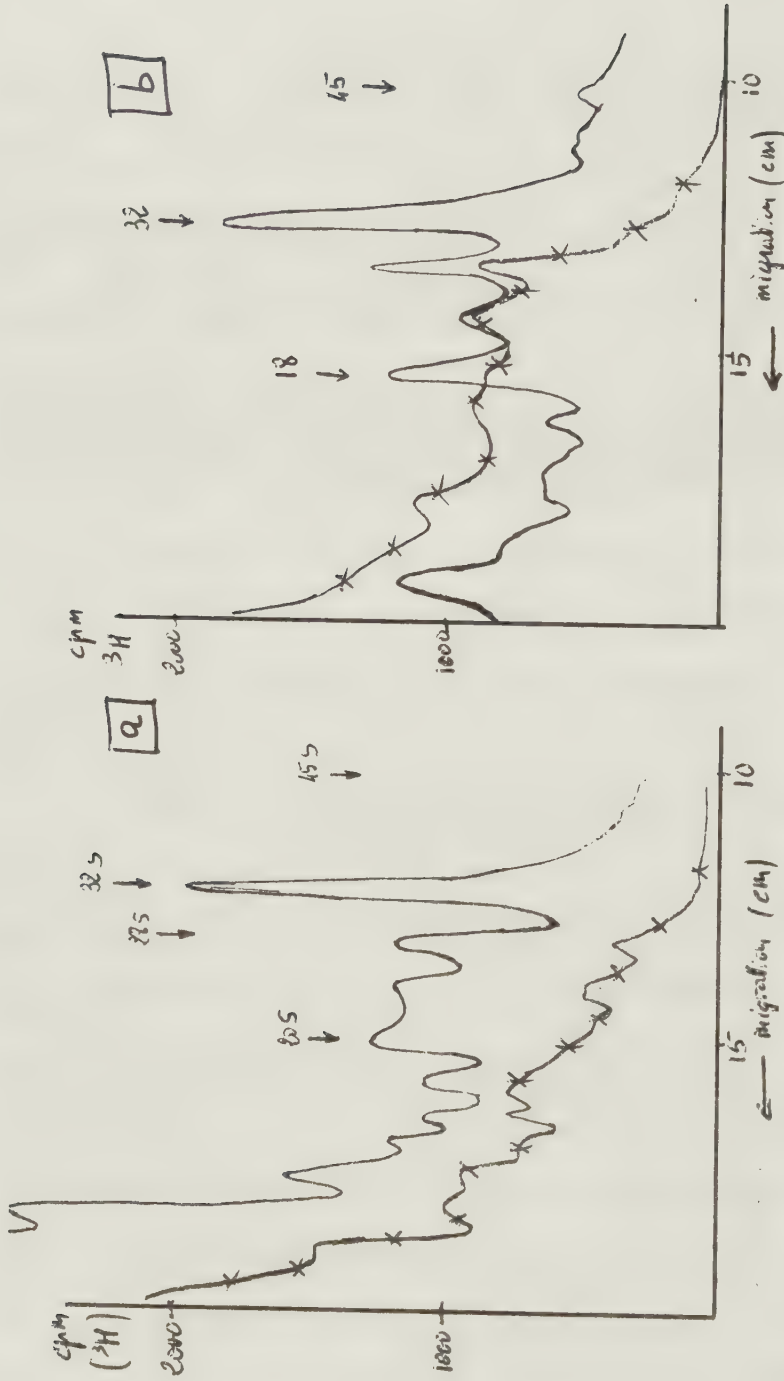


Figure 6 : Analyse de l'ARN libéré du nucléole (—) au terme de l'incubation in vitro.

L'ARN qui est resté lié aux structures nucléolaires a été également analysé (---).

- a) Incubation dans les conditions standard. b) Incubation en présence d'ion Mn^{2+} .

dire celui qui subit in vitro l'hydrolyse la plus réduite, est libéré préférentiellement au cours de l'incubation des nucléoles isolés : 85 % de la radioactivité est libérée dans le cas d'un marquage in vivo de 18 heures, au lieu de 40 % dans le cas d'un marquage in vitro de 30 minutes.

Si l'incubation in vitro est effectuée en présence d'ion Mn^{++} qui ralentit le phénomène de dégradation in vitro de l'ARN nucléolaire, la sortie d'ARN nucléolaire est considérablement réduite. Cependant, cette réduction ne semble pas directement reliée à l'effet inhibiteur de l'ion Mn^{++} : elle est très nette encore quand l'ARN est peu sensible à l'hydrolyse in vitro (après 18 heures de marquage in vivo). Il semble que, in vitro, l'ion Mn^{++} puisse modifier les structures nucléolaires isolées : nous avons noté précédemment (chapitre 2, partie I) que sa présence réduit considérablement l'efficacité du traitement permettant d'extraire les pré-ribosomes nucléolaires. Son effet sur des structures chromatiniques peut être *décelé* en microscopie optique.

Nous avons analysé par électrophorèse l'ARN nucléolaire extrait respectivement du culot et du surnageant à 500 g obtenus après incubation des nucléoles. Les résultats décrits fig. 6 confirment la présence prédominante dans le surnageant extra-nucléolaire des formes d'ARN les plus mûres.

Il semble donc bien que les éléments qui contiennent les ARNs nucléolaires les plus mûres soient, de façon préférentielle, libérés du nucléole, durant l'incubation in vitro, sans subir de dégradation importante. Par contre, les ARNs nucléolaires peu mûres subissent à l'intérieur du nucléole une dégradation poussée et les produits formés restent engagés dans les structures nucléolaires.

Ce phénomène mis en évidence in vitro au niveau de nucléoles isolés est à rapprocher des observations faites in vivo : l'ARN nouvellement transcrit ne peut diffuser librement dans le noyau de la cellule.

En effet, les produits peu maturés semblent maintenus dans des régions intranucléolaires définies par des liaisons relativement fortes qui ne peuvent être levées qu'après transformations de ces produits, à la fin du cycle intranucléolaire de réactions de maturation. Ces résultats sont également à rapprocher de ceux concernant l'isolement des préribosomes nucléolaires. Divers auteurs (WARNER et SOEIRO -1967- LIAU et PERRY -1969-) avaient signalé l'extraction plus difficile des éléments nucléolaires contenant l'ARN 45S précurseur ribosomique. Nous avons nous-mêmes constaté un phénomène analogue quand nous avons substitué à la technique d'extraction exhaustive des préribosomes, décrite dans le chapitre 2, une technique plus "douce" conduisant à une libération différentielle des éléments RNPs nucléolaires (voir chapitre suivant).

La sortie préférentielle, lors de l'incubation *in vitro*, des éléments contenant l'ARN nucléolaire le plus maturé, peut indiquer que les facteurs qui permettent les réactions terminales de la maturation nucléolaire restent présents et actifs au niveau des nucléoles que nous pouvons isoler.

La nature RNP des éléments libérés du nucléole durant l'incubation *in vitro* reste à préciser. Leur caractérisation biochimique est actuellement entreprise. Nous nous proposons de déterminer parallèlement l'effet de l'incubation sur l'organisation ultra-structurale de l'appareil nucléolaire, par une étude en microscopie électronique.

CONCLUSION :

Il semble donc que soient présents et actifs dans le nucléole isolé, divers facteurs permettant l'élongation et la terminaison des chaînes d'ARN préribosomique en cours de transcription ainsi que ceux qui contrôlent la complétion d'étapes intranucléolaires tardives de la maturation préribosomique. A l'inverse, sont absents ou inactivés, les facteurs qui interviennent au niveau de l'initiation de la transcription des molécules d'ARN et ceux qui déterminent la spécificité des hydrolyses de l'ARN préribosomique au cours des premiers stades de maturation intranucléolaire.

Nous avons précédemment mis en évidence un transfert intranucléolaire rapide de protéines nouvellement synthétisées hors du nucléole et établi des corrélations entre l'arrivée de ces protéines dans le nucléole et la synthèse d'ARN préribosomique (BACHELLERIE 1972).

Nous examinons actuellement, par utilisation du système nucléolaire acellulaire, le rôle régulateur éventuel de protéines d'origine cytoplasmique sur le fonctionnement nucléolaire in vitro. En particulier, nous nous proposons de déterminer si les étapes fonctionnelles qui ne peuvent être réalisées in vitro par le nucléole isolé sont sous la dépendance de facteurs cytoplasmiques.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE 2

ISOLEMENT SELECTIF DE DIVERS
CONSTITUANTS NUCLEOLAIRES

INTRODUCTION

Dans l'étude corrélative des rapports entre structure et fonction au niveau de l'appareil nucléolaire, nous avons tenté de définir une autre approche expérimentale qui consiste à mettre au point des moyens d'isolement sélectifs permettant de libérer du nucléole isolé des constituants fonctionnellement définis en vue d'établir ultérieurement leur effet sur l'organisation ultrastructurale du nucléole par examen en microscopie électronique.

Dans un premier stade, nous avons entrepris de caractériser, du point de vue biochimique, l'effet de divers procédés qui, appliqués aux nucléoles isolés, peuvent permettre une déstructuration plus ou moins poussée de l'appareil nucléolaire.

En substituant aux conditions qui conduisent à une extraction exhaustive des préribosomes nucléolaires (voir chapitre 2), des conditions plus "douces" nous avons pu obtenir une libération par paliers de différents types de composants nucléolaires qui, dans les conditions primitivement définies, étaient extraits en une seule opération. Ainsi, les RNPs nucléolaires de 55S qui contiennent l'ARN de 32S, sont alors libérées dans des proportions nettement plus élevées que les RNPs nucléolaires moins mûrées, ce qui peut correspondre à des degrés de liaison moindres avec les éléments de la trame nucléolaire. Par ailleurs, en comparant le système de lyse nucléolaire par l'héparine au système déjà décrit par WARNER, nous avons pu montrer qu'il permettait, outre une extraction plus complète de l'ARN et de l'ADN, l'extraction différentielle d'une classe de protéines nucléolaires, non liées à des acides nucléiques, et dont la biosynthèse, ou le transfert dans le nucléole, n'est pas immédiatement sensible à un blocage de la biosynthèse de l'ARN préribosomique, comme c'est le cas pour les protéines intégrées dans les préribosomes nucléolaires. L'isolement de cette classe de protéines nucléolaires peut permettre d'en préciser le rôle dans le fonctionnement nucléolaire, à l'aide, en particulier, du système d'incubation in vitro des nucléoles isolés, qui a été défini dans le chapitre précédent.

I. CONDITIONS D'EXTRACTION MENAGÉE DES COMPOSANTS NUCLEOLAIRES PAR TRAITEMENT PAR L'HEPARINE.

Dans les conditions de lyse nucléolaire primitivement définies (1^{er} Part. Ch.2), la chromatine nucléolaire était dissociée par action d'un polyanion, l'héparine, suivie par une hydrolyse extensive de l'ADN obtenue

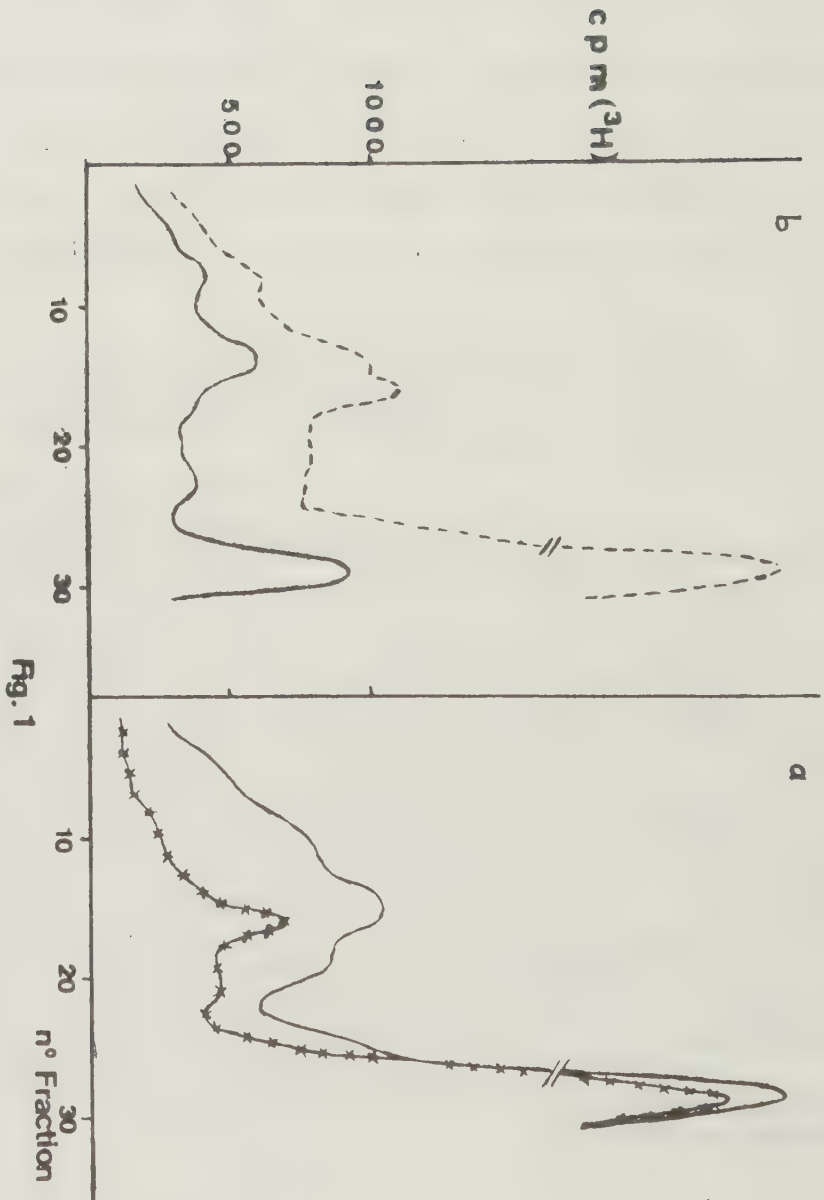


FIGURE 1: ANALYSE DES PROTEINES NUCLEOLAIRES EXTRAITES PAR LE TRAITEMENT PAR L'HEPARINE,
DANS LES CONDITIONS STANDARD D'EXTRACTION (—) ET DANS LES CONDITIONS
D'EXTRACTION "DOUCES" (---)

Les cellules d'hépatome du rat sont marquées pendant 30 minutes par incorporation de L-Leucine (^3H)

a) extractions comparées

b) extractions successives : les éléments non extraits dans les conditions

"douces" sont traités à nouveau dans les conditions standard. (—). Résultante des 2 extractions successives

(---)

par traitement par la DNAase, la déstructuration nucléolaire étant ensuite complétée par un court traitement de la suspension par des oscillations soniques. Nous avons précédemment observé que ce dernier traitement était essentiel ^{pour} une extraction exhaustive des préribosomes. Nous avons entrepris de déterminer systématiquement l'effet de son omission sur la libération des différents constituants nucléolaires. Les résultats de dosages chimiques effectués sur les extraits nucléolaires obtenus après sonication ou en l'absence de sonication, sont montrés dans le tableau 1. On voit que si, dans les deux cas, l'ADN nucléolaire est extrait dans sa presque totalité, par contre, les conditions "douces" ne permettent plus d'extraire que 50 % environ de l'ARN (au lieu de 90 %) et 50 % des protéines (au lieu de 65 %). D'après les résultats de dosages chimiques effectués sur les nucléoles isolés -c'est-à-dire, pour les cellules d'hépatome ascitique, 7,8 g de protéines, 1,2 g d'ARN par nucléole- et en considérant la teneur relative moyenne en protéines et ARN des RNPs nucléolaires, il apparaît que la réduction du taux de sortie des protéines est due, en majeure partie, à la libération moindre des RNPs nucléolaires. Cette hypothèse a trouvé une confirmation dans les résultats qui sont décrits figure 1.

Les cellules d'hépatome ascitique ont été marquées par 30 minutes d'incorporation de L-leucine (³H) puis les nucléoles ont été isolés selon la méthode décrite dans la chapitre 1. Après traitement par l'héparine (0,5 %) et la DNAase (100 µg/ml) de la suspension nucléolaire dans le tampon TMK, une moitié de la suspension est directement centrifugée à 25 000 g. L'autre moitié est soumise à 10 secondes de sonication (appareil RAYTHEON 10 kcycles) avant d'être également centrifugée 10 minutes à 25 000 g. Les surnageants 25 000 g sont ensuite analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose (15-30 % dans le tampon TMK) pendant 2 heures à 42 000 t/mn (rotor SPINCO SW 50).

La comparaison des profils de radioactivité incorporée dans les protéines nucléolaires (fig. 1a) montre bien que la lyse nucléolaire en l'absence d'une sonication se caractérise par une libération réduite des RNPs nucléolaires tandis que les protéines marquées qui se retrouvent dans

TABLEAU 1

EXTRACTION DES CONSTITUANTS NUCLEOLAIRES APRES TRAITEMENT PAR
L'HEPARINE DANS LES CONDITIONS PRIMITIVES OU EN L'ABSENCE DE
SONICATION.

Après traitement des nucléoles isolés, selon la méthode originelle {décrite Part. 1, chapitre 2} ou modifiée par suppression de la sonication, les lysats nucléolaires sont centrifugés 10 minutes à 25 000 g. Sur des parties aliquotes de l'extrait nucléolaire (surnageant 25 000 g), l'ADN est dosé selon la technique de BURTON (1956) modifiée par GILES et MYERS (1965), l'ARN par la méthode à l'orcinol (MEJBAUM-1939-) et les protéines selon LOWRY et al. (1951).

	% e x t r a i t	
	conditions standard	conditions "douces"
ADN	95	95
ARN	90	50
PROTEINES	65	50

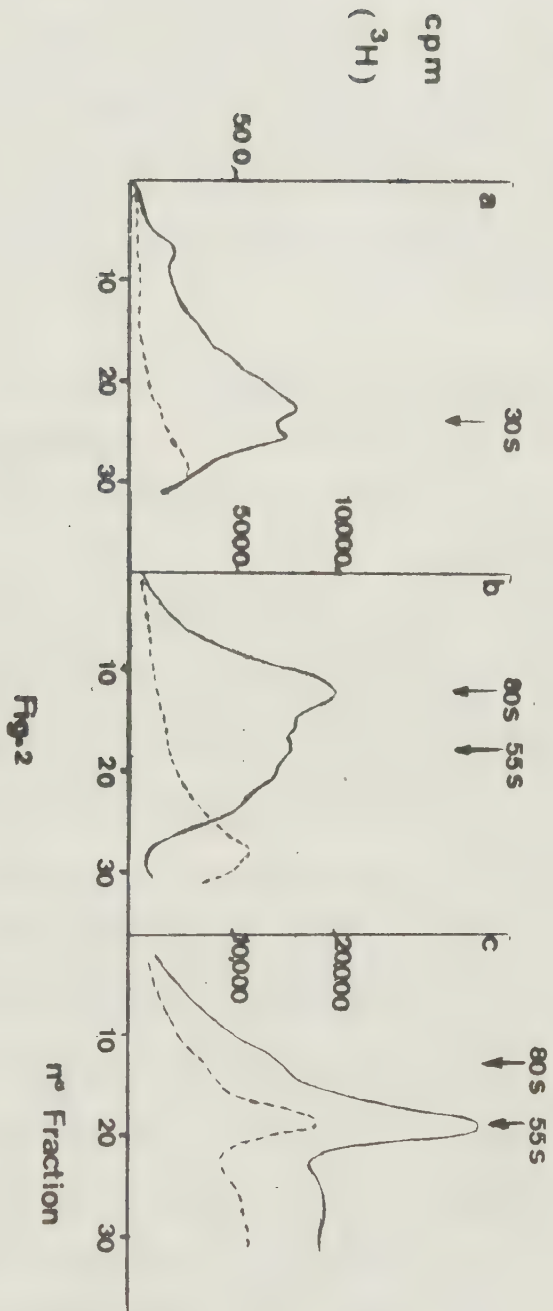


FIGURE 2 : ANALYSE DES RNPs NUCLÉOLAIRES EXTRAITES PAR LE TRAITEMENT PAR L'HEPARINE
 DANS LES CONDITIONS STANDARD D'EXTRACTION (—)
 DANS LES CONDITIONS D'EXTRACTIONS "DOUCES" (---)

Les cellules d'hépatome ascitique du rat sont marquées par incorporation d'uridine (^3H) pendant 3 minutes (a), 30 minutes (b), ou 4 heures (c) puis les nucléoles sont isolés et les RNPs extraites dans les deux conditions étudiées.

les dernières fractions du gradient sont extraites dans des proportions très voisines dans les deux cas. Si le culot 25 000 g obtenu dans les conditions de lyse sans sonication est réextrait par un traitement identique mais complété par une sonication, les RNPs non extraites dans le premier cas sont alors libérées (fig. 1b). Le profil de radioactivité correspondant à la somme des éléments nucléolaires successivement extraits dans ces deux cas a été reconstruit sur la fig. 1b, il est très analogue à celui qui est obtenu directement dans le cas de l'extraction exhaustive.

Nous avons examiné si la sortie plus difficile, dans les conditions de lyse nucléolaire ménagée, concernait également les divers types d'ARNs nucléolaires.

Les cellules d'hépatome ascitique ont été marquées pendant des temps croissants, par incorporation d'uridine (^3H). Les nucléoles isolés ont subi le traitement par l'héparine, en omettant ou non le stade de sonication et les extraits nucléolaires (surnageant 25 000 g) ont été analysés comme précédemment, par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose. Les résultats sont décrits sur la figure 2. Pour des temps de marquage de 3 et de 30 minutes, l'application des conditions "douces" ne permet de libérer qu'une proportion faible de l'ARN nucléolaire marqué (respectivement 15 et 20 %). L'ARN extrait se retrouve préférentiellement dans les éléments à faible vitesse de sédimentation (fig. 2a et fig. 2b). Par contre, après un marquage des cellules pendant 4 heures, l'ARN est extrait en proportions plus importantes (50 %), comme cela avait été constaté par dosage chimique de l'extrait nucléolaire (tableau 1). La majeure partie de l'ARN marqué après 4 heures d'incorporation qui est extrait dans les conditions de lyse ménagée est retrouvé sous forme d'éléments de type 55S (fig. 2c).

En définitive (dans ces conditions de lyse ménagée) nous avons observé que ni les RNPs sédimentant dans la zone 20-50S -qui contiennent l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé et qui ont les propriétés des précurseurs des préribosomes de 80S- (BACHELLERIE et al.-1975a) ni ces préribosomes de 80S eux-mêmes, ne sont extraits de façon notable, tandis que les préribosomes plus maturés de type 55S peuvent être libérés dans des proportions relativement importantes. Ce résultat peut correspondre à un degré de liaison avec la matrice protéique nucléolaire plus faible pour ces éléments que pour les préribosomes moins maturés. Cette observation est à rapprocher de celle faite lors de l'étude du système d'incubation in vitro de nucléoles isolés : les éléments nucléolaires préférentiellement libérés des structures nucléolaires au cours de l'incubation sont ceux qui contiennent l'ARN le plus maturé.

2. ETUDE COMPAREE DE DEUX SYSTEMES DE DISSOCIATION NUCLEOLAIRE DEJA DECRITS POUR L'ISOLEMENT DES PRERIBOSOMES.

Le procédé utilisant l'action de l'héparine et permettant l'extraction exhaustive des éléments RNPs nucléolaires, a été comparé au système précédemment décrit par WARNER et al.(1967) et faisant intervenir le dithiothréitol en l'absence d'ion Mg^{++} . Cette dernière technique a été mise en oeuvre sur notre matériel cellulaire dans les conditions décrites dans le chapitre 3.

Les constituants nucléolaires retrouvés dans le surnageant 25 000 g après la lyse nucléolaire, ont été dosés chimiquement dans les deux cas. Les résultats sont montrés dans le tableau 2. On constate que les éléments nucléolaires sont extraits de façon plus complète par le traitement par l'héparine, qu'il s'agisse de l'ARN, de l'ADN ou des protéines. Nous n'avons pas observé, dans le cas de l'extraction selon la technique de WARNER, une libération préférentielle d'un type donné d'ARN nucléolaire : le pourcentage d'extraction d'ARN marqué ne varie pas de façon significative avec la durée du marquage.

Cet auteur avait constaté que l'ARN 45S s'extrayait, dans ces conditions, plus difficilement que l'ARN nucléolaire plus maturé, de type 32S. La différence entre ce résultat et le nôtre semble tenir aux caractéristiques bien distinctes des nucléoles isolés dans les deux cas. Les

TABLEAU 2EXTRACTIBILITE DES CONSTITUANTS NUCLEOLAIRES DANS DEUX TECHNIQUESD'ISOLEMENT DES PRERIBOSOMES.

Les dosages chimiques sont effectués, comme indiqué dans le tableau 1, sur l'extrait nucléolaire (surnageant 25 000 g) obtenu soit par la technique faisant intervenir l'héparine (décrite Part I Ch2), soit selon le procédé décrit par WARNER et al. (1967), utilisant l'action de dithiothrèitol en présence d'EDTA.

	% e x t r a i t	
	par l'héparine	par le DTI
A D N	95	60
A R N	90	70
Protéines	65	40

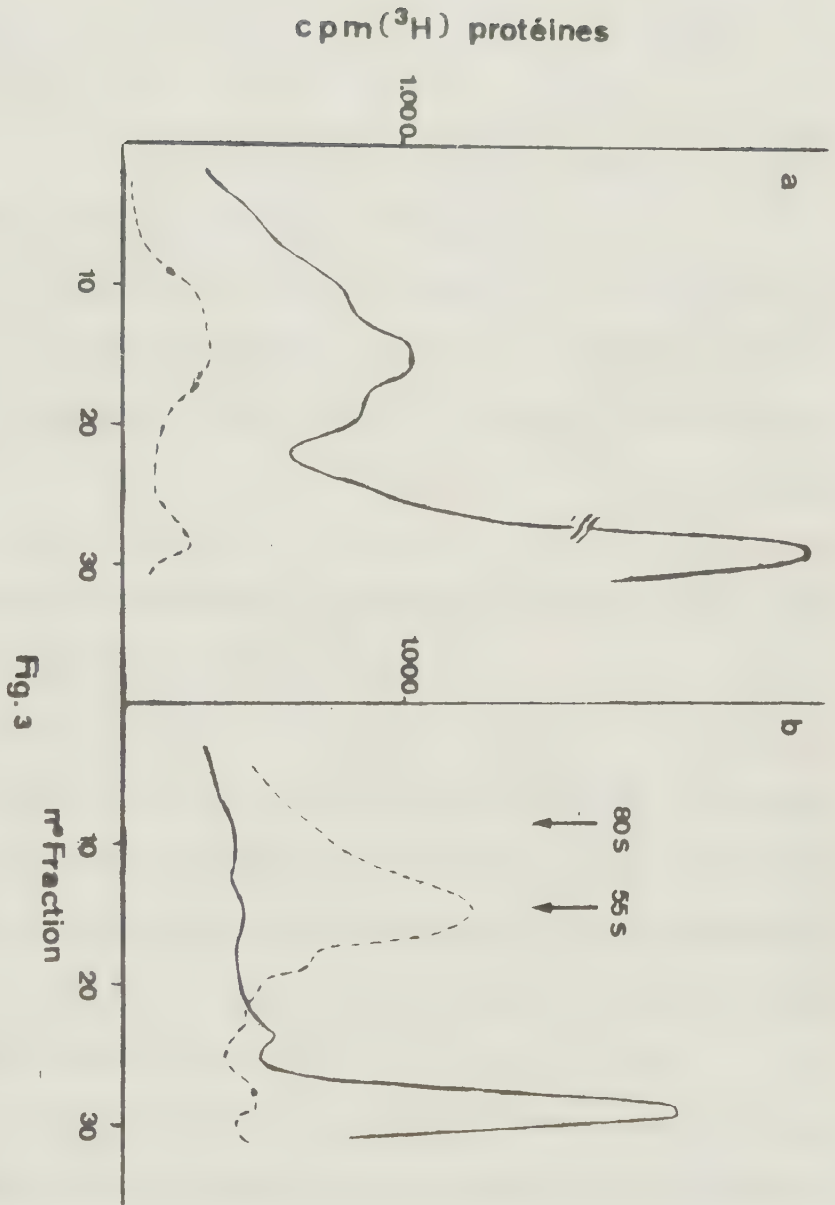


Fig. 3

FIGURE 3 : EXTRACTIONS COMPARÉES DES PROTÉINES NUCLÉOLAIRES, PAR LE TRAITEMENT PAR L'HÉPARINE, OU DANS LES CONDITIONS DÉCRITES PAR WARNER (1967).

Les cellules d'hépatome ascitique du rat ont été marquées pendant 30 minutes par incorporation de L-Leucine (^3H).

a) Traitement par l'héparine (—) ; extraction Warner sur les éléments non extraits par l'héparine (---)
 b) Extraction Warner (---) Traitement par l'héparine des éléments non extraits par le procédé Warner (—).

nucléoles sont isolés par WARNER selon le procédé mis au point par PENMAN et al. (1966)-dans lequel la rupture des noyaux est obtenue par destruction extensive de la chromatine sous l'effet d'une haute force ionique et par traitement par la DNAase- Dans ces conditions, les nucléoles sont pratiquement dépourvus de chromatine, alors que par la technique d'isolement que nous utilisons, la chromatine nucléolaire est relativement bien préservée. C'est cette différence d'état des nucléoles dans les deux cas qui explique vraisemblablement que l'application stricte du procédé d'extraction défini par WARNER ne permette, sur les nucléoles que nous isolons, qu'une libération très faible des RNPs nucléolaires. Ce n'est qu'après une courte sonication, c'est-à-dire dans des conditions plus drastiques que les conditions originales, qu'une libération importante des RNPs nucléolaires peut être obtenue.

En ce qui concerne les protéines nucléolaires, plus du tiers des protéines qui sont extraites par le traitement par l'héparine ne sont pas libérées par l'action du dithiothréitol en l'absence de Mg^{++} . Il est possible de calculer que ces protéines ne peuvent correspondre simplement aux protéines liées spécifiquement à l'ARN et l'ADN nucléolaires qui sont alors extraits de façon moins poussée par le procédé de WARNER. Il semble, en fait, que ces protéines nucléolaires extraites différenciellement par l'héparine correspondent, pour l'essentiel, aux protéines qui se marquent rapidement in vivo et qui sont retrouvées, après analyse par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose, dans les fractions à plus faible vitesse de sédimentation (voir chapitre 4). La confirmation directe en est apportée par les résultats de l'expérience décrite fig. 3.

Les nucléoles sont isolés de cellules d'hépatome ascitique marquées pendant 45 minutes par incorporation de Leucine (3H). Une moitié de la préparation est traitée selon le procédé à l'héparine, l'autre moitié par le procédé de WARNER. Les extraits nucléolaires sont analysés par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose (respectivement fig. 3a et fig. 3b). Les culots 25 000 g, correspondant au matériel non extrait à ce stade, sont repris pour une nouvelle extraction, mais en

croisant les techniques utilisées par rapport à la première extraction. Les éléments extraits par cette seconde opération sont également analysés par ultracentrifugation de densité de saccharose (fig. 3a et 3b).

Les protéines préférentiellement extraites par le traitement par l'héparine se retrouvent en majeure partie dans les fractions sédimentant le moins rapidement.

Ces fractions doivent contenir, dans le cas de la lyse par l'héparine, les protéines de la chromatine nucléolaire. Il semble cependant que les protéines chromatiniques ne représentant qu'une faible part du marquage des protéines retrouvées dans les fractions à plus faible vitesse de sédimentation. En effet, les fractions 10-20S, au niveau desquelles sédimmente la majeure partie de l'ADN extrait par le procédé de WARNER (fig. 4) -c'est-à-dire dans des conditions physicochimiques où la plupart des protéines chromatiniques doivent rester liées à l'ADN- ne contiennent qu'un marquage protéique très faible par rapport à celui des protéines préférentiellement extraites par le traitement par l'héparine.

CONCLUSION.

Cette étude comparative a montré qu'il est possible d'isoler une classe particulière de protéines nucléolaires.

Ce résultat a été obtenu par une déstructuration en deux temps de l'appareil nucléolaire: dans une première étape, le procédé de WARNER * permet de libérer les préribosomes et la chromatine; les protéines en question peuvent alors être extraites du résidu de la première extraction par le traitement par l'héparine.

Ces protéines sont distinctes des protéines liées à la chromatine nucléolaire ou aux préribosomes nucléolaires. Elles se caractérisent, par rapport aux autres protéines de la matrice nucléolaire, par un degré de liaison plus faible avec les structures nucléolaires et par leur rapide apparition dans le nucléole peu après leur synthèse extra-nucléolaire. (chapitre 4). Cette classe de protéines peut correspondre, au moins partiel-

lement, aux protéines à durée de vie intranucléolaire courte qui peuvent contrôler l'activité nucléolaire et dont l'absence, faute d'un renouvellement possible, peut être responsable de l'inaptitude des nucléoles isolés à effectuer certaines fonctions définies dans le système d'incubation *in vitro* (voir chapitre 1, partie 2).

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE 3

DISSOCIATION PROGRESSIVE IN VITRO DE NUCLEOLES ISOLES

A) ETUDE BIOCHIMIQUE

INTRODUCTION

L'isolement de régions définies de chromatine native peut permettre de préciser les mécanismes qui règlent l'expression génétique chez les eucaryotes. Dans cette voie, les nucléoles constituent un matériel de base particulièrement intéressant du fait de leur spécialisation fonctionnelle et des possibilités d'isolement. Cependant, les séquences codant pour l'ARN ribosomique représentent généralement moins de 0,5 % de l'ADN lié au nucléole. Un fractionnement plus poussé de la chromatine nucléolaire est donc indispensable pour envisager une étude fine des régions actives.

Nous avons entrepris la définition d'un système de dissection physicochimique de nucléoles isolés par une étude corrélative biochimique et ultrastructurale.

La dissociation des structures nucléolaires isolées peut être contrôlée par le niveau de la concentration en ion Mg^{++} .

Par centrifugation différentielle, trois classes de constituants nucléolaires peuvent être isolées, en proportions variables selon le niveau de dissociation réalisé.

- Des "corps" nucléolaires -nucléoles plus ou moins dépourvus de leurs constituants natifs- sont récupérés sous forme de culot 1 500 g. La "coque" de chromatine périnucléolaire peut être enlevée pour des concentrations définies en ion Mg^{++} .*
- Des structures nucléolaires modérément dissociées sont retrouvées sous forme de culot 25 000 g. Des arrangements complexes RNPs-chromatine, qui ressemblent à des types d'organisation définis in situ, peuvent y être identifiés.*

- Des éléments nucléolaires extensivement dissociés -à savoir, les constituants élémentaires RNP et DNP- restent dans un surnageant 25 000 g. Le constituant DNP sédimente vers 10-15S et est nettement séparé des préribosomes de 80 et 55S.

Ce système de dissociation contrôlée peut permettre de préciser les relations fonctionnelles qui existent entre des éléments dont la situation topographique à l'intérieur du nucléole est différente, comme les chromatines intra- et péri-nucléolaires.

Pour préciser l'organisation et le fonctionnement du génome chez les mammifères, l'étude de la chromatine nucléolaire peut se révéler particulièrement intéressante.

Malgré son organisation spatiale particulière et son association étroite avec des structures non-chromatiniennes relativement complexes -ce qui peut se traduire par des propriétés quelque peu différentes de celles de la chromatine non-nucléolaire- la chromatine nucléolaire représente un modèle d'étude privilégié :

- 1) elle peut conserver, au terme de processus d'isolement, ses caractéristiques ultrastructurales essentielles et ses relations topographiques avec le "corps" nucléolaire. Cette propriété est particulièrement importante pour d'éventuelles études *in vitro* de cette matrice chromatinienne. On sait en effet que la structure de la chromatine joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle *in vivo* (voir revue par RINGERTZ -1972-).
- 2) De nombreuses études biochimiques et ultrastructurales ont déjà permis de préciser le fonctionnement nucléolaire et particulièrement sa spécialisation dans la biosynthèse des ribosomes, dont différentes étapes et divers intermédiaires de maturation ont été identifiés (voir 1ère Partie, ch. 2 et 3).

Dans ce système hautement structuré, diverses relations ont pu être établies entre état fonctionnel et organisation topographique de certains éléments nucléolaires.

Des études par autoradiographie ont montré la spécialisation fonctionnelle de certaines zones subnucléolaires et en particulier l'activité transcriptionnelle de la chromatine intranucléolaire (GRANBOULAN et GRANBOULAN -1965- SIMARD et al.-1969-).

C'est pour tenter de préciser, au niveau nucléolaire, les relations structurales et fonctionnelles entre les principaux constituants de cet organelle que nous avons entrepris la mise au point d'un système de dissection physicochimique des structures nucléolaires.

Nous avons eu pour objectif de déterminer des conditions de dissociation ménagée du nucléole permettant un isolement différentiel de divers constituants, en relation avec leurs diverses situations topographiques et, par suite, leurs liaisons différentes dans l'appareil nucléolaire.

Le système que nous avons défini -dans lequel la dissociation progressive des structures nucléolaires est contrôlée par le niveau de la concentration en ion Mg^{++} - peut aider à établir des corrélations entre le rôle fonctionnel de certains éléments nucléolaires (et en particulier les séquences activement transcrites d'ADN ribosomique), leur localisation topographique et leur organisation structurale.

RESULTATS

L'étude en microscopie électronique (décrite dans le chapitre suivant) a montré que l'organisation ultrastructurale du nucléole isolé est étroitement dépendante de la concentration en ion Mg^{++} .

Nous avons utilisé les modifications ultrastructurales, provoquées par l'effet de variations dans la concentration en ion Mg^{++} , pour réaliser un fractionnement de constituants nucléolaires. Les structures nucléolaires plus ou moins modifiées sous l'effet de différentes concentrations en ion Mg^{++} sont partiellement dissociées par ultra-sonication et plusieurs types d'éléments subnucléolaires sont séparés par centrifugation différentielle.

I. DESCRIPTION DU SYSTEME DE DISSOCIATION ET DE FRACTIONNEMENT

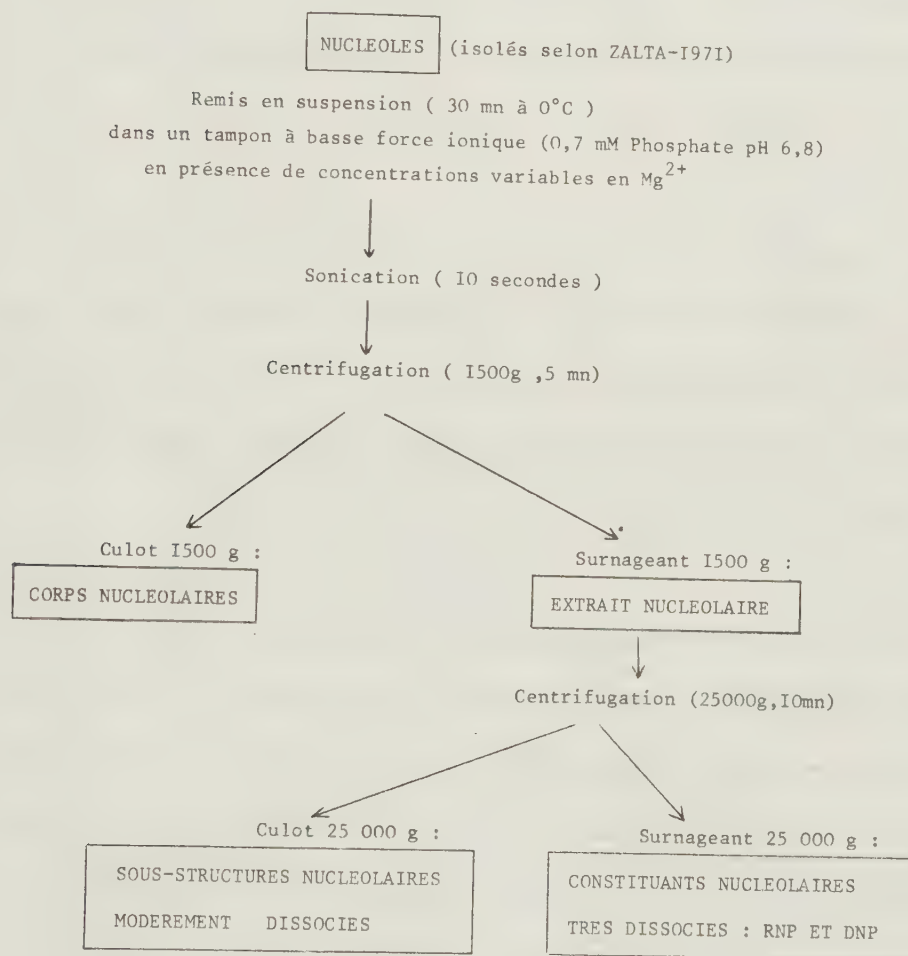
Mode opératoire :

Les nucléoles sont isolés par la méthode décrite dans le chapitre 1 (ZALTA et al.-1971-).

Les nucléoles isolés sont lavés par remise en suspension dans le tampon TMK et centrifugation de la suspension à 1 500 g pendant 5 min. (JOUAN E 95) dans des tubes coniques en verre. Le surnageant est éliminé et la surface interne du tube est soigneusement séchée avec du papier filtre. Chaque culot de nucléoles (en moyenne 2×10^7 nucléoles) est alors remis en suspension par pipetage dans 1 ml de tampon phosphate (0,7 mM en phosphate de potassium pH = 6,8) contenant différentes concentrations en $MgCl_2$.

La suspension nucléolaire est laissée 30 minutes à 0°C avant de subir une sonication de 10 secondes (appareil BRANSON J 22, ultrasonicateur équipé d'une microsonde et fonctionnant à 100 W.). Le fractionnement par centrifugation différentielle des éléments plus ou moins dissociés est effectué selon le schéma 1. La centrifugation à 25 000 g est réalisée dans un rotor angulaire SORVALL (SS 34) tournant à 14 000 t/mn.

Tableau I : SCHEMA DU FRACTIONNEMENT DES NUCLEOLES ISOLEES.



En l'absence de sonication, et pour les différentes concentrations en Mg⁺⁺ qui ont été étudiées, l'ADN, l'ARN et les protéines nucléolaires restent en totalité liés aux structures nucléolaires isolées malgré les modifications plus ou moins importantes qui ont été provoquées dans l'orga-

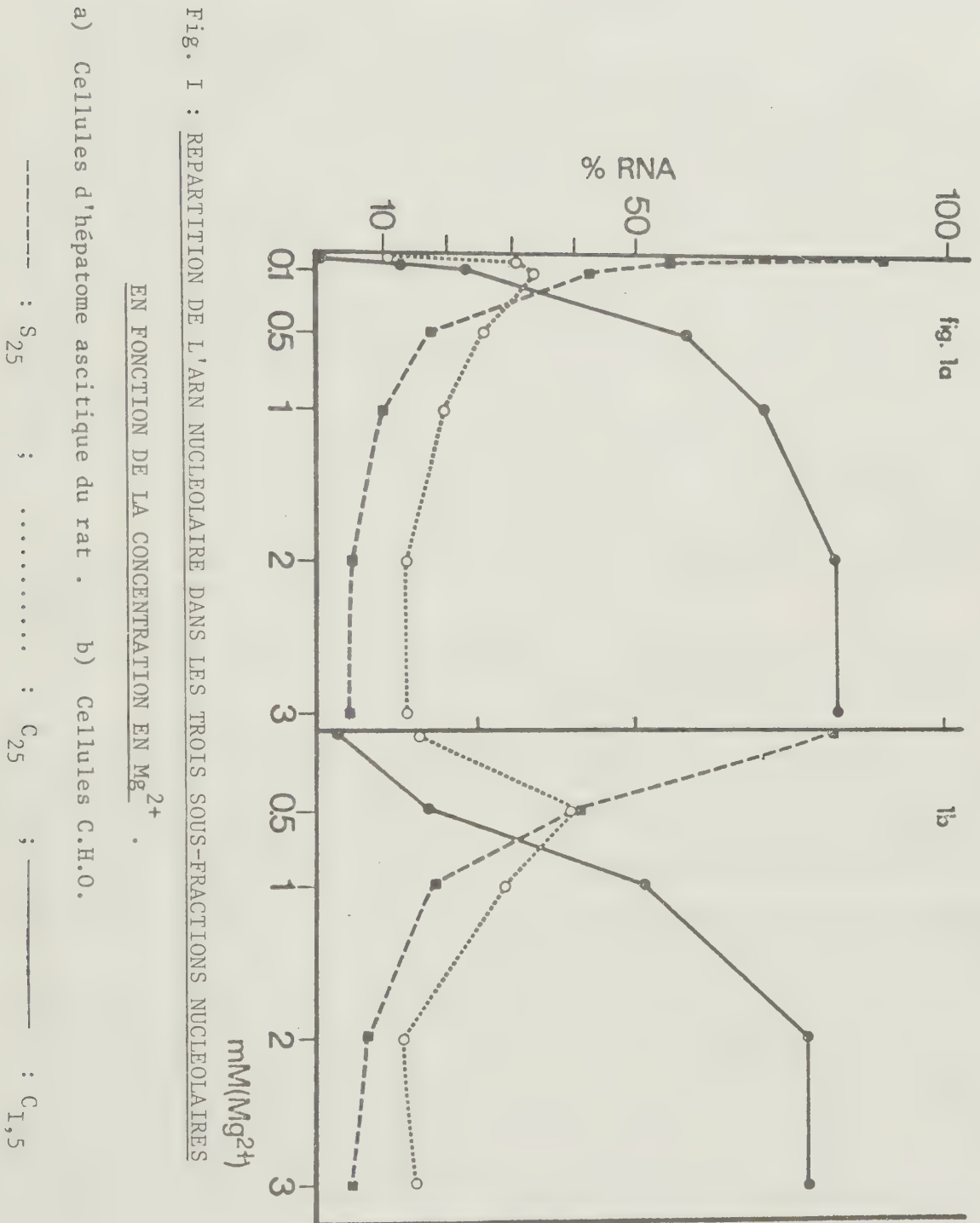
nisation de l'organelle isolé (voir chapitre suivant). Du point de vue ultrastructural, ces changements apparaissent partiellement réversibles. Les éléments nucléolaires peuvent être libérés, après sonication de la suspension, dans des proportions qui dépendent du niveau de la concentration en ion Mg^{++} .

Nous avons défini opérationnellement comme "extrait nucléolaire" le surnageant 1 500 g, récupéré après 5 minutes de centrifugation, de la suspension nucléolaire soniquée. Ces conditions permettent une récupération complète de nucléoles isolés non traités.

La fraction "culot 1500 g" sera dite fraction "corps nucléolaire" l'étude en microscopie électronique (chapitre suivant) montre qu'elle est constituée essentiellement de nucléoles qui sont progressivement dépourvus de certains de leurs constituants natifs quand la concentration en ion Mg^{++} est diminuée.

D'après des expériences préliminaires et d'après les contrôles en microscopie électronique, il a paru intéressant de fractionner l'extrait nucléolaire par une centrifugation à 25 000 g. On sait que, dans ces conditions, les RNPs préribosomiques libres restent dans le surnageant. Des structures nucléolaires moins dissociées peuvent être récupérées dans le culot 25 000 g.

L'analyse biochimique de ces trois fractions ($C_{1\ 500}$, $S_{25\ 000}$ et $C_{25\ 000}$) a été effectuée, en ce qui concerne le contenu chimique, les taux de renouvellement des principales classes de constituants et, enfin, la distribution en taille et l'organisation supramoléculaire de ces constituants.



2. REPARTITION DE L'ARN NUCLEOLAIRE

La répartition de l'ARN entre les 3 sous-fractions nucléolaires a été déterminée en fonction de la concentration en ion Mg^{++} dans le milieu de dissociation (fig. 1), pour les cellules d'hépatome ascitique du rat (1a) et par les cellules CHO (1b). Ces valeurs ont été déterminées pour l'ARN nucléolaire marqué, après 3 heures d'incorporation d'uridine (3H) par les cellules entières, c'est-à-dire pour un temps de marquage au bout duquel les profils en densité optique à 260 nm et en radioactivité pour l'ARN nucléolaire global sont très analogues. Ces diagrammes de répartition sont très reproductibles.

a) Hépatome ascitique :

Pour les cellules d'hépatome ascitique (fig. 1a), l'ARN nucléolaire est complètement extrait en l'absence de Mg^{++} et 90 % de cet ARN se retrouvent dans la fraction S_{25} .

Au fur et à mesure que la concentration en ion Mg^{++} augmente, la part d'ARN retrouvé dans S_{25} diminue régulièrement, la diminution étant particulièrement importante dans la zone de concentration 0-0,5 mM.

Au-delà de 2 mM, la fraction S_{25} contient moins de 5 % de l'ARN total.

En l'absence de Mg^{++} , la fraction C_{25} ne contient que 10 % de l'ARN nucléolaire. Quand la concentration en Mg^{++} est progressivement augmentée, la part d'ARN nucléolaire retrouvé dans C_{25} s'accroît nettement, avec un maximum vers 0,1 à 0,2 mM en Mg^{++} . Pour des concentrations supérieures, la part d'ARN dans C_{25} décroît progressivement comme c'est le cas pour la fraction S_{25} . En conséquence, la part d'ARN dans $C_{1,5}$ croît rapidement quand la concentration en Mg^{++} est portée à 0,5 mM et continue à croître pour des valeurs supérieures : à partir de 2 mM, cette fraction contient plus de 80 % de l'ARN nucléolaire.

b) Cellules CHO :

La répartition de l'ARN varie d'une manière très similaire (fig. 1b) . Cependant, la zone dans laquelle le contenu de S_{25} décroît rapidement s'étend jusqu'à 1 mM (au lieu de 0,5 mM pour les cellules d'hépatome ascitique). Plus généralement, il apparaît qu'une répartition quantitativement identique peut être obtenue quand la dissociation est réalisée en présence de concentrations en Mg^{++} légèrement supérieures (par rapport aux cellules d'hépatome).

Dans ces conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de différences dans l'extratibilité des diverses espèces moléculaires d'ARN nucléolaire.

Quand l'ARN est extrait de chacun des 3 sous-fractions puis est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les 3 profils de radioactivité qui sont obtenus sont pratiquement superposables, quelle qu'ait été la concentration en Mg^{++} utilisée pour réaliser la dissociation des nucléoles isolés.

Ce résultat est confirmé par une autre voie : quand la durée de marquage de l'ARN nucléolaire est diminuée, de manière à modifier, dans des proportions très importantes, la répartition du marquage entre les divers types d'ARNs nucléolaires, les diagrammes de distribution restent quantitativement les mêmes que ceux présentés dans la figure 1 : des cellules CHO ont été marquées d'une part, par l'uridine (3H), respectivement pendant 3 minutes, 30 minutes ou 3 heures et, d'autre part, par l'uridine (^{14}C) pendant 3 heures. Chaque culot de cellules marquées au tritium a été mélangé à un culot de cellules marquées au 14 carbone et les nucléoles ont été isolés dans les trois cas. La dissociation nucléolaire a été réalisée en présence

de concentrations variables en ion Mg^{++} , et le rapport de radioactivité $\frac{(^3H)}{(^{14}C)}$ a été déterminé pour les 3 sous-fractions nucléolaires, $C_{1,5}$, C_{25} et S_{25} . Pour un temps donné de marquage par l'uridine (3H), les valeurs obtenues pour ce rapport sont exactement identiques pour les 3 sous-fractions, quelle que soit la concentration en Mg^{++} utilisée pour dissocier le nucléole.

Il apparaît donc que, dans ces conditions de déstructuration du nucléole et d'isolement d'éléments plus ou moins dissociés, les différentes formes moléculaires d'ARN préribosomique sont présentes, au niveau des sous-fractions obtenues, dans des proportions identiques à celles du nucléole total.

3. REPARTITION DE L'ADN NUCLEOLAIRE

Elle a été déterminée, comme pour l'ARN, pour les cellules d'hépatome ascitique du rat (fig. 2a), et pour les cellules CHO (fig. 2b), dans les mêmes conditions expérimentales, les cellules ayant été marquées pendant 3 heures par incorporation de thymidine (3H). Dans ce cas encore, les résultats sont très reproductibles.

Pour les deux espèces cellulaires étudiées, la presque totalité de l'ADN nucléolaire est extraite en l'absence de Mg^{++} et se retrouve essentiellement dans la fraction S_{25} . Quand la concentration en Mg^{++} est augmentée, la proportion d'ADN extrait diminue progressivement comme c'est le cas pour l'ARN.

De même, la proportion d'ADN retrouvé dans la fraction C_{25} s'accroît parallèlement. Cependant, au fur et à mesure que la concentration en Mg^{++} est augmentée, une différence nette apparaît entre l'extraction

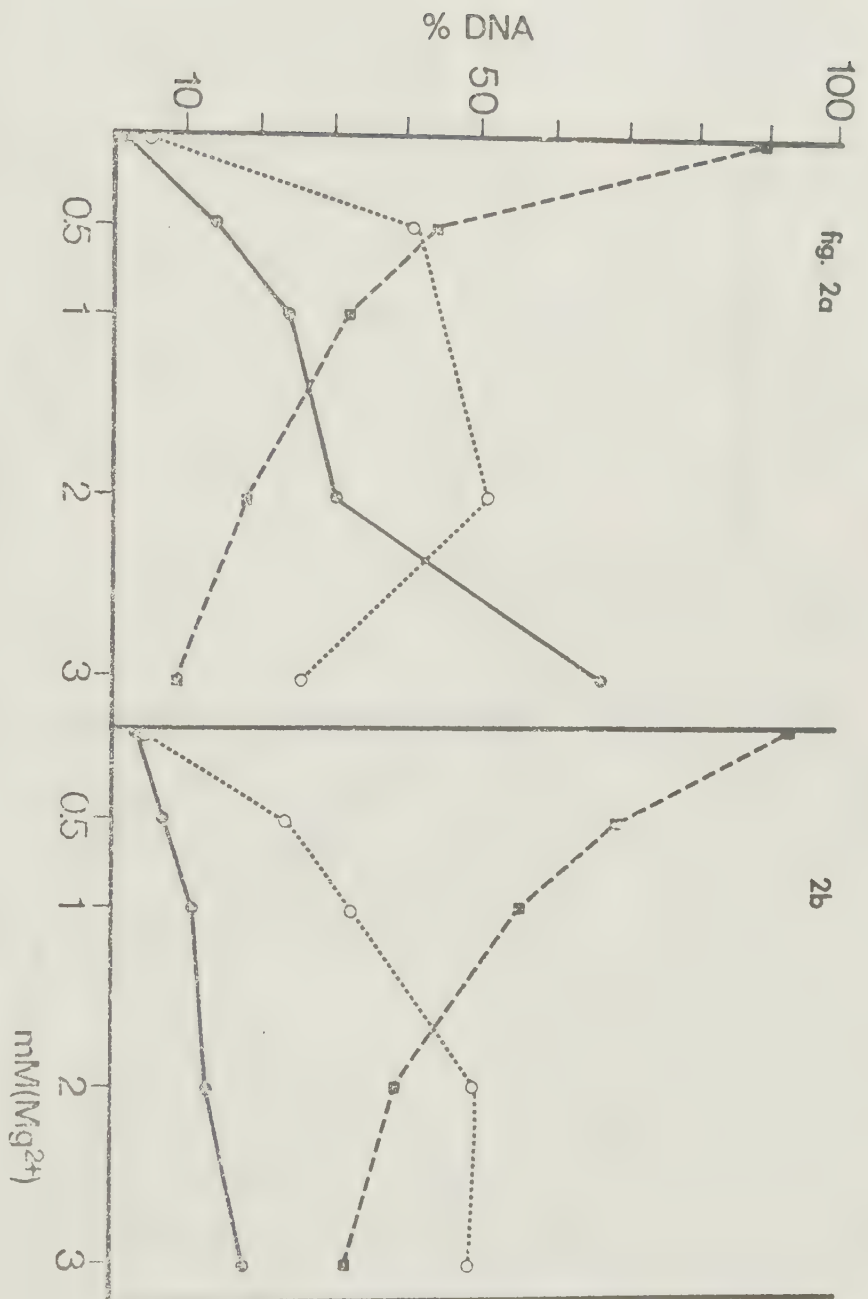


Fig. 2 : REPARTITION DE L'ADN NUCLEOLAIRE DANS LES TROIS SOUS-FRACTIONS NUCLEOLAIRES
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Mg²⁺ .

Mêmes symboles que pour la Fig. 1.

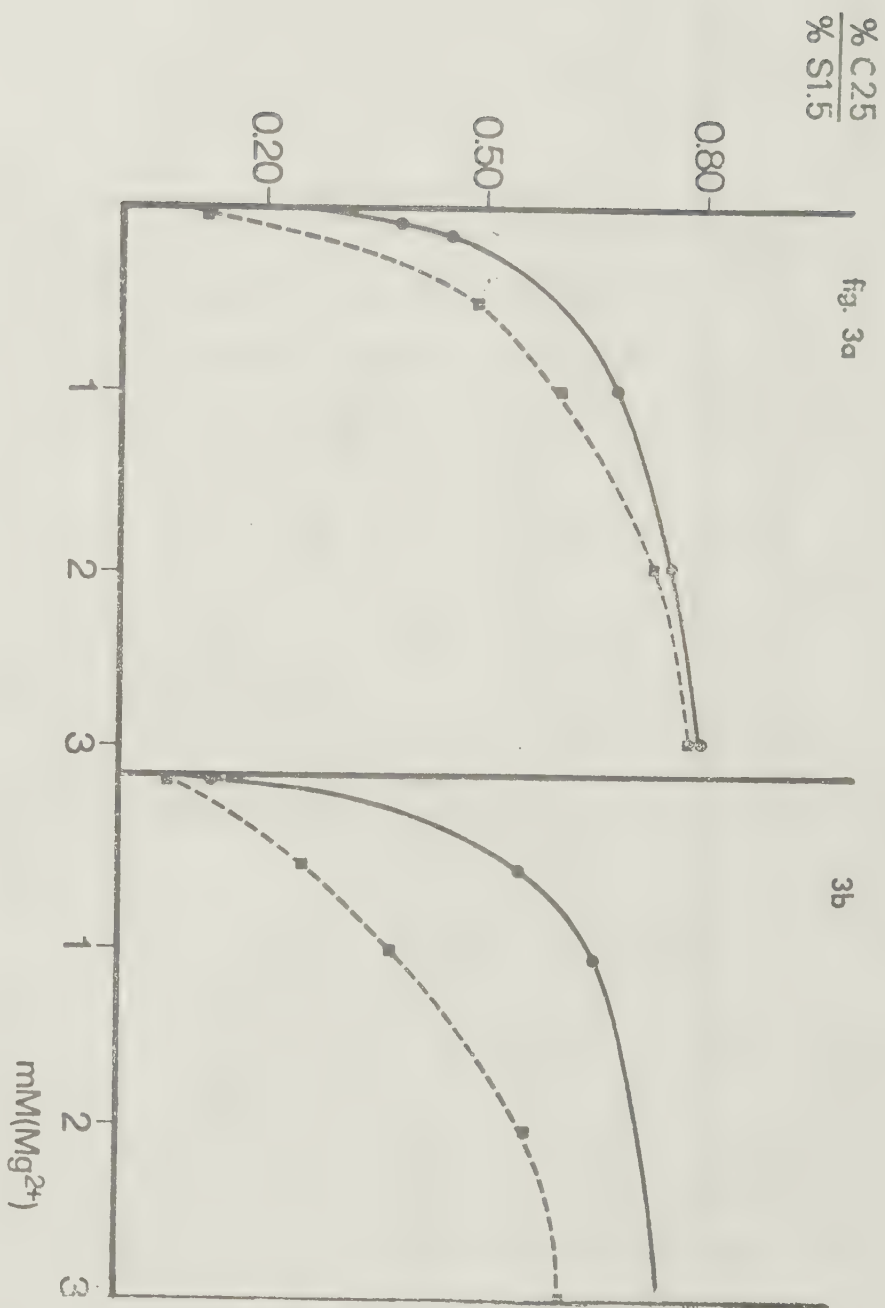


Fig. 3 : PROPORTION D'ARN ET D'ADN NUCLÉOLAIRES EXTRAITS RETROUVES DANS LA FRACTION C_{25} .

a) Cellules d'hépatome ascitique du rat . b) Cellules C.H.O. .

—●— : ARN ; —■— : ADN . Valeurs déterminées d'après les Fig. 1 et 2.

de l'ADN et celle de l'ARN. Ainsi, à 2 mM en Mg^{++} , environ 80 % de l'ARN marqué se retrouve dans la fraction "corps nucléolaire", pour les deux espèces cellulaires étudiées; cette fraction ne contient plus alors que 30 % (hépatome) ou 13 % de l'ADN nucléolaire (CHO). En contrepartie, la fraction S_{25} correspondante a un rapport $\frac{ADN}{ARN}$ 5 fois plus élevé que celui des nucléoles isolés non traités (cellules CHO).

Les diagrammes de répartition ne sont pas sensiblement modifiés quand on fait varier la durée de marquage de l'ADN (5 minutes ou 24 heures).

D'après les valeurs des diagrammes des Fig. 1 et 2, nous avons déterminé, respectivement, les proportions d'ARN et d'ADN extraits qui se retrouvent dans la fraction sédimentant rapidement (C_{25}). Les résultats sont montrés Fig. 3.

Les rapports considérés — respectivement $\frac{ARN \text{ dans } C_{25}}{ARN \text{ dans } S_{1,5}}$ et $\frac{ADN \text{ dans } C_{25}}{ARN \text{ dans } S_{1,5}}$ — croissent de façon continue avec la concentration en Mg^{++} .

Il semble donc que, lorsque la concentration en Mg^{++} augmente, l'ARN et l'ADN nucléolaires extraits restent liés à des structures de moins en moins dissociées et se retrouvent alors préférentiellement dans la fraction extraite qui sédimente le plus rapidement (C_{25}).

4. REPARTITION DES PROTEINES NUCLEOLAIRES .

Elle a été déterminée, pour les cellules d'hépatome ascitique (fig. 4a), par dosage chimique selon la méthode de LOWRY (1951), et pour les cellules CHO après marquage des protéines par incorporation d'acides aminés (^{14}C) par les cellules cultivées en suspension dans un milieu minimum essentiel complet, pendant 4 temps de génération.

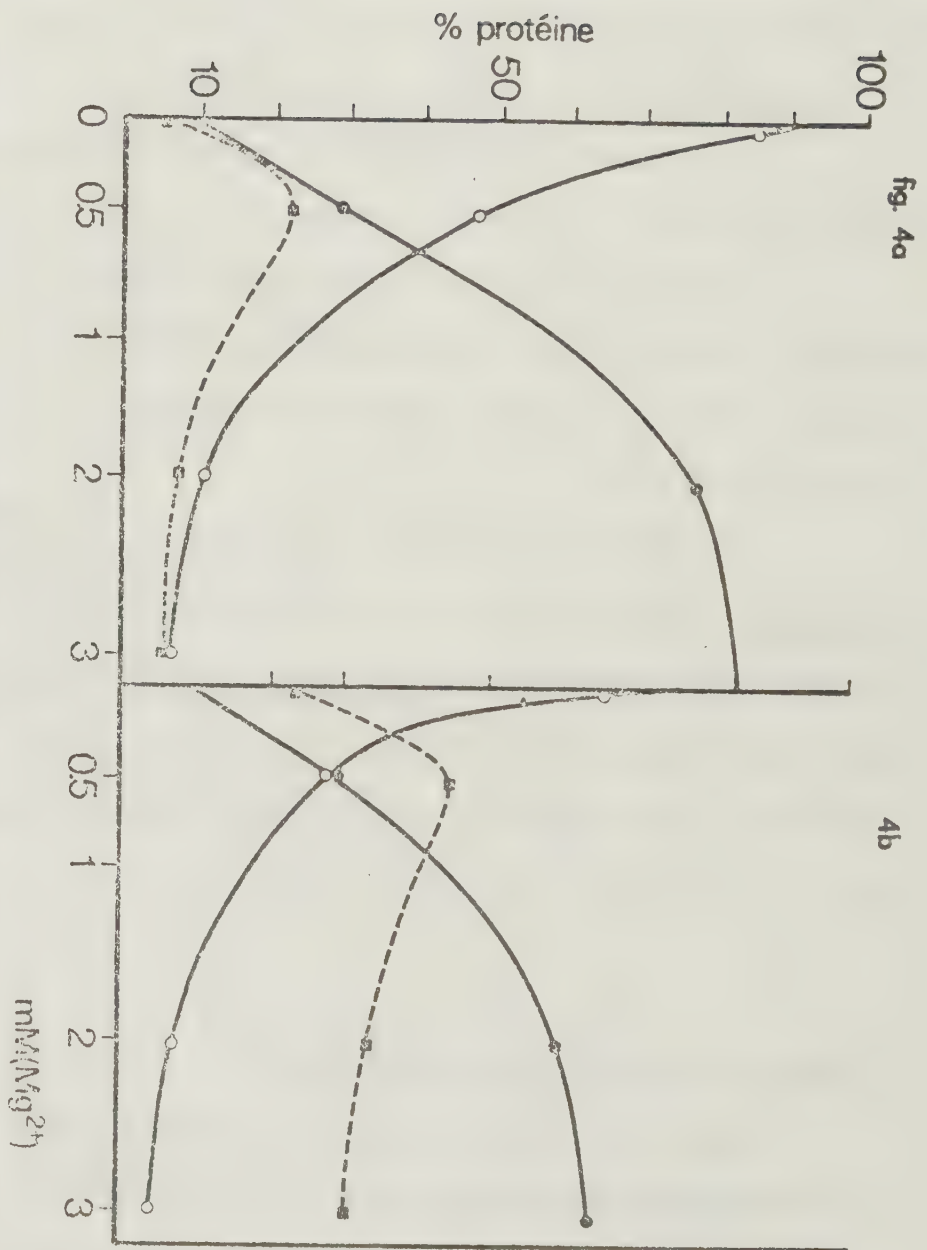


Fig. 4 : REPARTITION DES PROTEINES NUCLEOLAIRES DANS LES TROIS SOUS-FRACTIONS NUCLEOLAIRES
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Mg^{2+} .

Mêmes symboles que pour la Fig. 1 .

Pour les diverses concentrations étudiées, les profils de répartition sont très analogues à ceux obtenus pour l'ARN et l'ADN. Quantitativement, les valeurs obtenues sont généralement intermédiaires entre celles trouvées pour l'ARN et l'ADN.

Nous montrerons plus loin que les complexes élémentaires entre acides nucléiques et protéines ne sont pas dissociés au cours du fractionnement.

Il est possible de calculer approximativement la part de protéines nucléolaires qui ne sont pas directement intégrées dans ce type de complexes (chromatine ou préribosomes).

Ainsi, pour les cellules CHO, les dosages chimiques effectués sur les nucléoles isolés ont donné respectivement les résultats suivants : 5 pg de protéines, 1,3 pg d'ARN et 1,2 pg d'ADN (valeurs par nucléole). Par ailleurs, les déterminations faites sur les RNPs préribosomiques isolés et sur la chromatine isolée indiquent des rapports $\frac{\text{Protéine}}{\text{Acide nucléique}}$ de 1 et 1,5 respectivement. On peut calculer, d'après les valeurs précédentes, que 1,8 pg de protéines ne sont pas intégrées dans les préribosomes ou la chromatine, par nucléole isolé. Il est également possible de déduire des valeurs précédentes et des diagrammes de répartition de l'ARN, de l'ADN et des protéines comment, de manière très approximative, se répartit cette classe de protéines dans les 3 sous-fractions étudiées.

Il apparaît, d'après ces déterminations, que ces protéines nucléolaires non directement liées aux acides nucléiques sont pratiquement absentes de la fraction S_{25} quand la dissociation est effectuée à des concentrations en ion Mg^{++} supérieures à 0,5 mM. D'une façon générale, cette classe de protéines semble se retrouver préférentiellement dans la fraction "corps nucléolaire" ($C_{1,5}$) pour les diverses concentrations en Mg^{++}).

5. ANALYSE DES ELEMENTS NUCLEOLAIRES LES PLUS DISSOCIES (FRACTION S_{25})

Les cellules CHO ont été marquées pendant 4 heures par incorporation d'uridine (^{14}C) et de thymidine (^3H). Après isolement des nucléoles puis dissociation in vitro de ces nucléoles isolés, des parties aliquotes de la fraction S_{25} ont été analysées par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose (15-30 %) dans le tampon NEB, c'est-à-dire en présence d'EDTA, de façon à réduire au minimum les interactions entre les divers types de complexes protéines-acides nucléiques. Les valeurs de S ont été attribuées par référence à des ribosomes cytoplasmiques analysés en parallèle.

Les profils de radioactivité sont décrits fig. 5a. Le marquage en ARN se répartit en 3 fractions principales : la majeure partie sédimente vers 55S. Un épaulement est visible dans la région 80S; par des temps de marquage plus courts, la part de radioactivité retrouvée dans cette région est nettement plus importante. Les vitesses de sédimentation de ces éléments sont identiques à celles déterminées pour les RNPs préribosomiques isolés du nucléole par d'autres procédés (voir 1ère partie, chap. 2). Une troisième fraction de l'ARN marqué se retrouve dans la zone 10-15S. Nous montrerons plus loin que cette fraction correspond, au moins partiellement, à l'apparition de produits d'hydrolyse in vitro d'éléments préribosomiques, au cours de la dissociation nucléolaire.

En vue de détecter si d'éventuelles interactions entre RNP et DNP étaient conservées au niveau des éléments de S_{25} séparés par ultracentrifugation et modifiaient leurs caractéristiques de sédimentation, les contrôles suivants ont été effectués:

a) une partie aliquote de la fraction S_{25} a été traitée par la RNAase

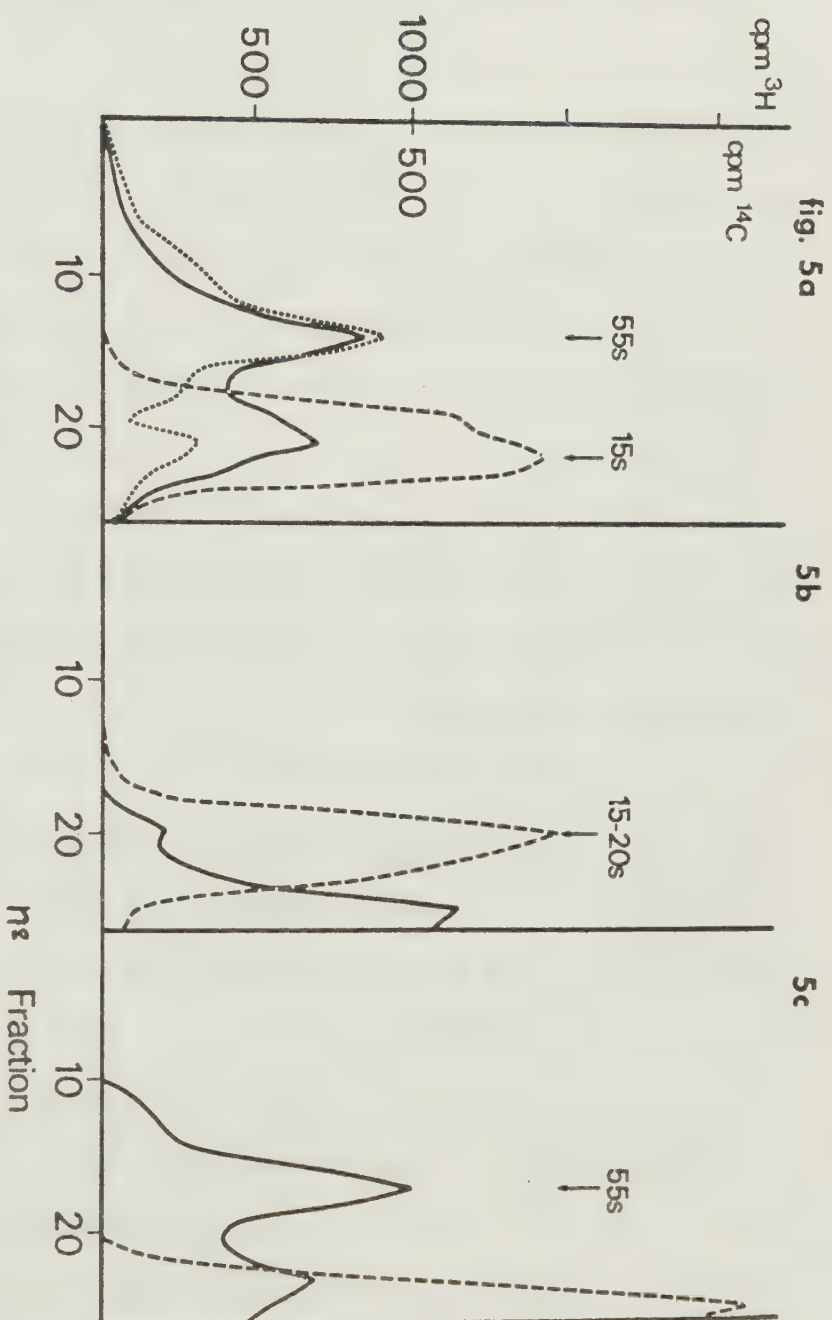


Fig. 5 : ANALYSE PAR ULTRACENTRIFUGATION SUR GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE (15-30 %) DE S_{25}

DISTRIBUTION DE L'ARN ET DE L'ADN NUCLEOLAIRES.

- a) Analyse directe de S_{25} b) Analyse après traitement par la RNAase (100 $\mu\text{g/ml}$) 10 mn à 37°C.
- c) Analyse après traitement par l'héparine (0,5 %) et la DNAase (100 $\mu\text{g/ml}$), 10 mn à 0°C .

(100 µg/ml) avant d'être analysée sur gradient de densité de saccharose. Le profil obtenu est montré fig. 5b; l'ARN marqué est extensivement hydrolysé, et le marquage au ^{14}C se retrouve uniquement dans les dernières fractions du gradient tandis que le profil de l'ADN marqué (^3H) n'est pas modifié (pic de radioactivité vers 10-15S).

- b) Une partie aliquote de S_{25} a été traitée par la DNAase (100 µg/ml), en présence de 0,5 % d'héparine de manière à obtenir une dissociation poussée des complexes DNPs. Dans ces conditions (fig. 5c), le pic de radioactivité ^3H à 10-15S disparaît, le marquage tritium étant déplacé vers les dernières fractions du gradient, tandis que le profil de marquage en ARN n'est pas modifié.

En définitive, la destruction exhaustive d'un type de complexe (RNPs ou DNPs respectivement) n'entraîne pas de modification des caractéristiques en sédimentation de l'autre type d'éléments.

c) Marquage des protéines :

Les cellules CHO ont été marquées par 20 minutes d'incorporation de leucine (^3H). Le profil de radioactivité obtenu après analyse par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose de la fraction S_{25} est montré fig. 6. Les pics de marquage en protéines coïncident avec ceux obtenus pour l'ARN (fig. 5). Pour cette durée de marquage, les protéines de la chromatine nucléolaire sont relativement peu marquées (voir 2ème partie, chap. 2). Le marquage protéique (fig. 6) est déplacé vers les fractions à très faible vitesse de sédimentation si un traitement préalable par la RNAase a été effectué sur la fraction S_{25} .

D'après leurs vitesses de sédimentation, d'après leur contenu en ARN (résultats non montrés) et leur nature RNP, il semble bien que les éléments sédimentant vers 80 et 55S correspondent aux formes majeures des préribosomes nucléolaires.

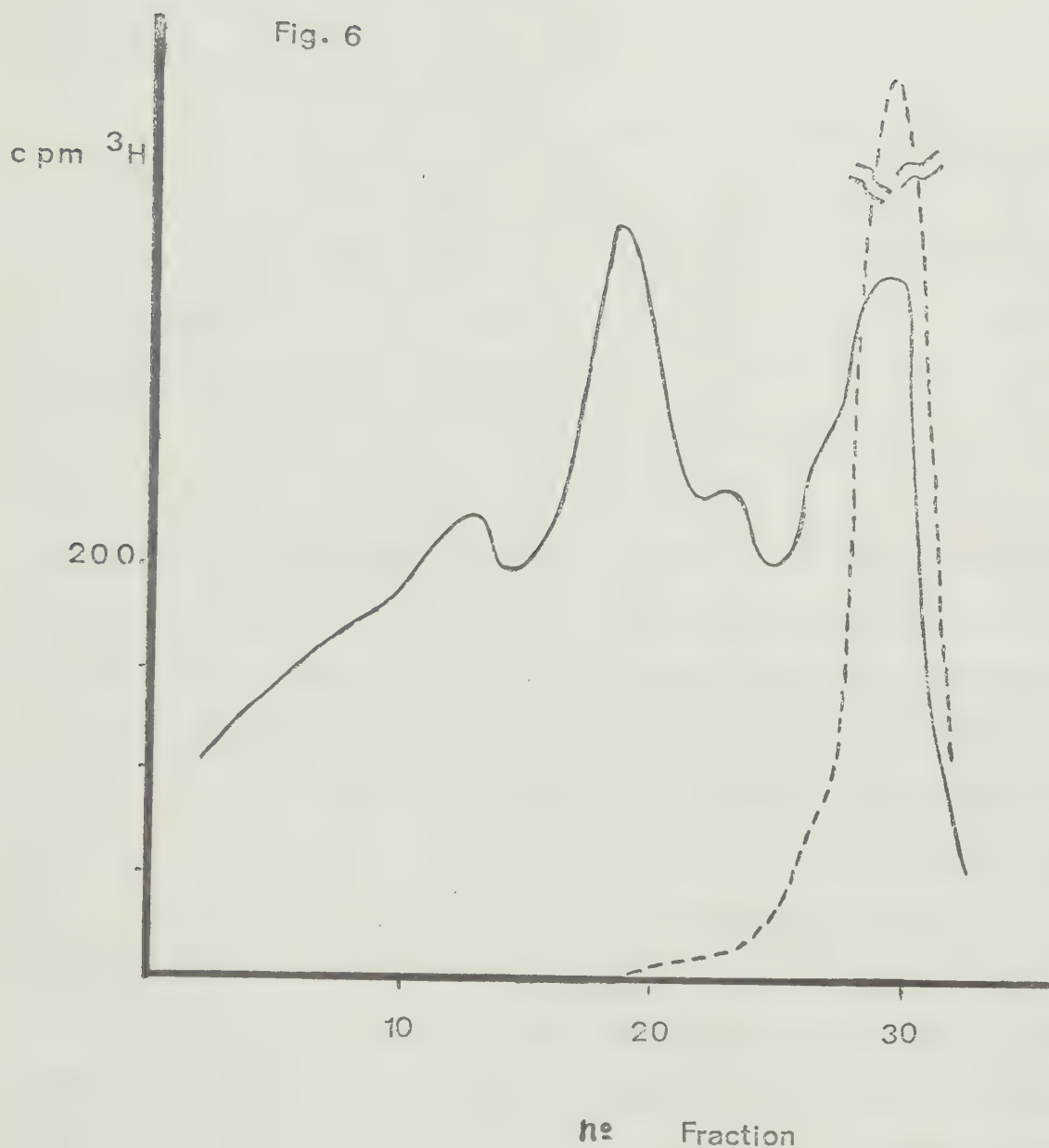


Fig. 6 : ANALYSE PAR ULTRACENTRIFUGATION SUR GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE (15-30%) DE LA FRACTION S_{25} : DISTRIBUTION DES PROTEINES RAPIDEMENT MARQUEES .

Après 20 mn d'incorporation de L-leucine (^3H), à 2 $\mu\text{C}/\text{ml}$, par les cellules d'hépatome ascitique du rat, les nucléoles sont isolés puis dissociés en présence de 0,5 mM en ion Mg^{2+} . Des parties aliquotes de S_{25} sont analysées comme décrit Fig.5 :

a) Analyse directe

(—————)

b) Analyse après traitement par la RNAase.

(- - - - -)

Une partie de l'ARN nucléolaire marqué est retrouvée dans la zone 10-15S. Cette fraction cosédimente avec les éléments contenant l'ADN marqué mais n'est pas déplacée par le traitement qui dissocie extensivement les complexes DNPs (héparine + DNAase).

Nous avons observé que la part d'ARN nucléolaire marqué qui se localise dans cette fraction est d'autant plus importante que la durée de marquage a été plus courte et que la concentration en ion Mg^{++} dans le milieu de déstructuration des nucléoles isolés a été plus élevée. L'ARN extrait de cette fraction a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-agarose : il est sous forme de molécules de 18S ou de taille inférieure à 18S avec une distribution relativement polydispersée.

Nous avons montré (1ère partie, chap. 3) qu'au cours de l'isolement des RNPs préribosomiques, une fraction de l'ARN nucléolaire est particulièrement sensible à une hydrolyse in vitro : le taux de dégradation est d'autant plus élevé que l'ARN est moins mûré; il est plus important en présence de Mg^{++} qu'en l'absence de Mg^{++} .

Enfin, nous avons observé que la fraction "80-55S" obtenue après analyse du S_{25} peut être partiellement transformée en éléments sédimentant vers 10-15S. La présence de ces éléments doit résulter d'une hydrolyse in vitro d'une fraction des préribosomes nucléolaires qui prend place au cours du processus de dissociation des nucléoles. Cet effet artificiel peut être notablement réduit en utilisant des milieux qui contiennent un inhibiteur puissant de RNAase, comme le DEPC (voir fig. 5a).

Les figures 5 et 6 représentent une analyse de la fraction S_{25} obtenue en l'absence d'ion Mg^{++} .

Quand la concentration en Mg^{++} est portée progressivement à 3 mM lors de la dissociation des nucléoles, les divers profils de radioactivité

obtenus après analyse par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose des fractions S_{25} correspondantes sont qualitativement similaires.

En particulier, les éléments DNP sont toujours retrouvés dans la zone 10-15S. Cependant, comme prévu d'après les résultats des figures 1 et 2, les rapports $\frac{RNA}{DNA}$ globaux sur l'ensemble du gradient diminuent avec la concentration en Mg^{++} utilisée pour obtenir le S_{25} .

Analyse des éléments DNPs de la fraction S_{25} .

Une mesure du rapport $\frac{Protéine}{ADN}$ des éléments contenant l'ADN nucléolaire marqué qui se retrouvent dans la zone 10-15S, a été effectuée. La fraction S_{25} a été préparée dans les conditions qui conduisent à une contamination minimum de la fraction 10-15S par les éléments RNPs produits par hydrolyse in vitro d'une partie de l'ARN préribosomique. Les fractions du gradient de saccharose au niveau desquelles se localise l'ADN marqué sont rassemblées et fixées par le formaldéhyde. Après 24 heures de fixation, des parties aliquotes sont déposées sur un gradient préformé (25-50 %) de CsCl et analysées, selon HANCOCK (1970), pour déterminer leur densité de flottation.

Parallèlement, de la chromatine extranucléolaire a été isolée de fractions non-nucléolaires des mêmes cellules CHO dont l'ADN a été préalablement marqué par incorporation de thymidine (3H). Des parties aliquotes de cette chromatine, préparée selon une méthode classique (BHORJEE et PEDERSON -1972-), ont été fixées et analysées dans les mêmes conditions.

Les densités sont déterminées, après ultracentrifugation, sur des parties aliquotes de fractions du gradient par mesure de l'indice de réfraction.

La majeure partie de l'ADN marqué est retrouvée — que ce soit pour

la chromatine non-nucléolaire préparée selon une technique classique, ou pour les fractions 10-15S obtenues à partir de S_{25} dans une zone de densité moyenne 1,47 g/cm³. Les densités de flottation ne varient pas de façon significative avec la concentration en Mg^{++} utilisée pour effectuer la dissociation nucléolaire et séparer la fraction S_{25} .

La valeur obtenue semble indiquer que, dans nos conditions de dissociation du nucléole isolé, les protéines chromatiniques restent probablement en majeure partie liée à l'ADN nucléolaire.

DISCUSSION.

Les changements structuraux induits par les ions divalents, et en particulier par l'ion Mg^{++} , sur les complexes protéines-acides nucléiques, comme les ribosomes (voir revue par SPIRIN -1974-) ou la chromatine (LEAKE et al. -1972-) ou sur des constituants subcellulaires plus organisés, comme le noyau (ANDERSON et al. -1951- ZALTA et al. -1973-) ont fait l'objet de nombreuses études et ont été extensivement utilisés, du fait de leurs effets généralement différentiels et spécifiques.

Dans un environnement à basse force ionique, la chromatine est maintenue dans un état dispersé par répulsion mutuelle entre des groupes phosphate chargés négativement, qui ne sont pas liés à des résidus d'acides aminés basiques. Quand ces groupes se trouvent neutralisés par fixation de cations, une condensation de la chromatine peut se produire.

In situ, la dispersion de chromatine condensée semble avoir une signification physiologique : MIRSKY et ses collaborateurs (FRENSTER, ALLFREY et MIRSKY -1963- LITTAU et al. -1965-; MIRSKY et al. -1968-) ont, les premiers, mis en évidence l'étroite corrélation qui existe entre le degré de dispersion de la chromatine et son activité transcriptionnelle. Des travaux récents (BARRY et MERRIAM -1972-) ont laissé entrevoir la possibilité que les transitions structurales observées in situ pour la chromatine soient contrôlées d'une certaine façon par le niveau de la concentration en cations libres dans la cellule. In vitro, LEAKE et al. (1972) ont montré qu'une transition nette et réversible entre un état condensé et un état dispersé de la chromatine peut être contrôlée par les valeurs de la concentration en ion Mg^{++} . Dans ces conditions, la concentration en Mg^{++} qui correspond à une demi-transition est caractéristique de la nature du complexe DNP étudié. On peut donc envisager, en utilisant cet effet, de réussir à isoler de la chromatine globale des fractions bien définies présentant des réponses particulières, quant aux modifications structurales induites par l'ion Mg^{++} .

Cependant, appliqué à des structures chromatiniques natives, l'effet de l'ion Mg^{++} ne doit pas dépendre seulement de la nature du complexe DNP mais aussi de ses relations structurales avec des éléments non-chromatiniens et de son intégration éventuelle dans un ensemble hautement organisé, comme c'est le cas pour la chromatine nucléolaire. Il peut donc constituer aussi un moyen permettant de modifier différenciellement des structures chromatiniques en fonction de leur situation topographique dans l'appareil nucléolaire, et ultérieurement de les isoler. C'est cette voie que nous avons entreprise d'explorer par une étude systématique de l'effet de l'ion Mg^{++} sur le niveau de déstructuration des nucléoles isolés.

Les nucléoles sont isolés des noyaux après rupture par sonication à basse force ionique, en présence de Ficoll, qui favorise la dispersion de la chromatine, selon le procédé de ZALTA et al. (1971) décrit dans le chapitre 1 (1ère partie). Cette méthode permet une bonne préservation de l'architecture nucléolaire et, en particulier, de la chromatine nucléolaire, ce qui est un préalable important pour envisager une étude poussée de l'ensemble du système transcriptionnel. Ce résultat ne peut être atteint par d'autres méthodes classiques d'isolement, en particulier quand la rupture des noyaux est réalisée par traitement par la DNAase, après gélification de la chromatine à force ionique élevée, comme c'est le cas dans le procédé de PENMAN et al. (1966).

La concentration en Mg^{++} de 3 mM s'était révélée optimum pour la préservation de la structure nucléolaire au cours du processus d'isolement (voir 1ère partie, chap. 1), le système de dissociation *in vitro* des nucléoles isolés a été étudié dans la zone 0-3 mM en ion Mg^{++} .

Fraction S_{25} .

En l'absence d'ion Mg^{++} , une déstructuration poussée peut être obtenue : la presque totalité des constituants nucléolaires sont retrouvés dans la fraction S_{25} (éléments à faible vitesse de sédimentation). Nos résultats indiquent que cette fraction S_{25} contient les éléments nucléolaires très dissociés, c'est-à-dire les complexes RNPs et DNPs libres, les associations pouvant exister entre eux *in situ* ayant alors été rompues.

Quand la concentration en ion Mg^{++} augmente, le contenu de la fraction S_{25} en ARN, en ADN et en protéines diminue graduellement. Cependant, le contenu qualitatif de cette fraction reste le même, si on se réfère aux résultats des analyses par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose : l'ARN est retrouvé sous forme de RNPs sédimentant comme les préribosomes nucléolaires déjà décrits (80 et 55S), tandis que l'ADN se localise dans les fractions 10-15S sous forme de DNP dont la densité de flottation et, par suite, le rapport approximatif Protéine/ADN est identique à celui déterminé pour une chromatine isolée selon une méthode classique. Il se pourrait cependant que des fractions de chromatine nucléolaire, isolées dans nos conditions expérimentales, diffèrent légèrement par leur contenu en protéines et en ADN, de l'ensemble de la chromatine nucléolaire. Les moyens de fractionnement et d'analyse qui ont été mis en oeuvre jusqu'ici ne permettent pas de les mettre en évidence.

En définitive, d'après ces résultats et d'après ceux de l'étude ultrastructurale (voir chapitre suivant), il apparaît que cette fraction DNP sédimentant vers 10-15S représente la chromatine nucléolaire, extensivement coupée dans nos conditions de dissociation.

Outre les éléments nucléolaires extensivement dissociés qui se retrouvent dans la fraction S_{25} , deux types d'éléments subnucléolaires moins dissociés peuvent être récupérés dans les fractions C_{25} et $C_{1,5}$, dans des proportions qui dépendent de la concentration en ion Mg^{++} qui a été utilisée.

A l'examen en microscopie électronique, ces deux fractions se sont révélées relativement homogènes, en ce qui concerne les dimensions des éléments qui peuvent y être décelés.

Fraction $C_{1,5}$.

La fraction $C_{1,5}$ que nous avons appelée fraction "corps nucléolaires" contient en effet, comme le confirme l'examen en microscopie électronique, des corps nucléolaires, plus ou moins préservés selon la concentration en Mg^{++} utilisée.

Un résultat intéressant est obtenu quand la dissociation est réalisée à 2 mM en Mg^{++} pour les cellules d'hépatome ascitique : la majeure partie de l'ARN reste alors associée aux corps nucléolaires qui apparaissent, en microscopie électronique, dépourvus de l'essentiel de leur chromatine périnucléolaire. En contrepartie, les fractions S_{25} et C_{25} contiennent l'essentiel de la chromatine nucléolaire tandis que les éléments RNP n'y sont présents qu'en faibles proportions. Un résultat similaire est obtenu à 3 mM en Mg^{++} pour les cellules CHO (voir fig. 1 et 2).

L'analyse de ces diverses fractions de chromatine nucléolaire peut permettre d'établir des corrélations entre un type d'organisation, au niveau moléculaire, du complexe DNP et sa situation topographique au sein de l'appareil nucléolaire. Nous développons actuellement notre étude dans ce sens. Nous nous proposons, en particulier, de rechercher, par des expériences d'hybridation moléculaire entre ADN et ARN ribosomique, si les cistrons ribosomiques sont présents dans les fragments subnucléolaires au niveau desquels la chromatine intra-nucléolaire semble préférentiellement préservée.

Fraction C_{25} .

La fraction C_{25} contient des éléments subnucléolaires de dimensions intermédiaires entre les complexes libres, RNP et DNP, retrouvés dans S_{25} et les "corps nucléolaires" de la fraction $C_{1,5}$. L'analyse directe par ultracentrifugation sur gradient de densité de saccharose de l'extrait nucléolaire global a montré que les éléments retrouvés dans le culot 25 000 g ont des vitesses de sédimentation variant entre 200 et 500S et qu'il existe au niveau de ces éléments séparés sur gradient un recouvrement important des marquages en ARN et en ADN. L'étude ultrastructurale a

permis de reconnaître dans cette fraction, des éléments très similaires aux éléments de types fibrillaire et granulaire qui peuvent être identifiés dans le nucléole *in situ*.

Pour les deux espèces cellulaires étudiées, la proportion d'ARN nucléolaire retrouvée dans la fraction C_{25} présente un maximum caractéristique vers 0,2 mM en ion Mg^{++} , de façon très reproductible. Cet effet peut être relié à une dispersion retardée -quand la concentration en Mg^{++} est abaissée- de certaines zones de chromatine intranucléolaire par rapport au reste de la chromatine nucléolaire. Il se pourrait alors, au cours de l'étape de sonication, que des zones subnucléolaires plus ou moins étendues soient préservées d'une déstructuration plus poussée, obtenue en l'absence de Mg^{++} , après dispersion du reste de la chromatine nucléolaire.

La fraction C_{25} n'est pas enrichie en un type particulier d'ARN préribosomique par rapport au nucléole isolé non dissocié. Un fractionnement plus poussé des éléments rassemblés dans C_{25} peut être envisagé. L'étude ultrastructurale de cette fraction (chapitre suivant) a montré qu'elle était composée d'éléments morphologiquement différents selon la concentration en ion Mg^{++} utilisée. Il semble donc que ces différences correspondent plutôt qu'à un isolement sélectif, à un effet différentiel du Mg^{++} sur l'ultrastructure de certains de ses constituants morphologiques.

L'isolement de ces éléments, retrouvés dans la fraction C_{25} , au niveau desquels une proportion importante de l'ARN et de l'ADN nucléolaire semble avoir partiellement conservé une organisation mutuelle ressemblant, à certains égards, à l'organisation *in situ*, peut permettre de développer l'étude d'un système chromatinien isolé et structuré (éventuellement encore associé aux produits précoces de sa transcription) et pouvant représenter un sous-ensemble d'organisation de l'appareil nucléolaire.

C'est dans ce but que nous envisageons de définir, à partir des résultats qui viennent d'être exposés, des conditions pouvant conduire à l'isolement plus sélectif de sous-structures nucléolaires et en particulier, des zones de chromatine activement transcrites.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE 4

DISSOCIATION PROGRESSIVE IN VITRO DE NUCLEOLES ISOLES

B) ETUDE ULTRASTRUCTURALE

INTRODUCTION

Les constituants nucléolaires ultrastructuraux ont été dissociés in vitro sous l'effet de concentrations variables en ion Mg^{++} .

La chromatine associée au nucléole subit un gonflement ou une décompaction importante quand la concentration en ion Mg^{++} est abaissée. Ces modifications ultrastructurales ont été utilisées, en combinaison avec un agent physique (sonication), pour obtenir une fragmentation contrôlée de l'appareil nucléolaire; une séparation préliminaire des éléments nucléolaires plus ou moins dissociés a été réalisée :

- le "corps nucléolaire" peut être isolé dans une fraction C_{15} (culot 1 500 g);*
- des structures fibrillaires et granulaires, ressemblant à cells identifiables in situ, sont retrouvées, en présence d'ion Mg^{++} , dans une fraction C_{25} (culot 25 000 g);*
- en l'absence complète d'ion Mg^{++} , on retrouve dans la fraction S_{25} (surnageant 25 000 g) des groupes de particules reliées entre elles par un filament. Ces images peuvent représenter, au moins partiellement, le déplacement des structures de base de l'organisation nucléolaire.*

L'étude de l'organisation du génome et de la régulation de la transcription chez les eucaryotes, représentent actuellement un des problèmes importants abordé en biologie moléculaire. Le nucléole constitue, de ce point de vue, un système modèle intéressant de chromatine spécialisée. Sa fonction majeure, la biogénèse des ribosomes, a été extensivement étudiée et diverses étapes des processus de la maturation ribosomique dans le nucléole ont été décrites (voir 1ère partie, chap. 2 et 3). Chacune de ces réactions de maturation peut constituer un niveau possible de contrôle de la production des ribosomes. Par ailleurs, la structure compacte de cet organelle permet de l'isoler dans un état de pureté élevé, les contaminations par du matériel extranucléolaire (chromatine non-nucléolaire, membranes, éléments cytoplasmiques) pouvant être extrêmement réduites (voir 1ère partie, chap. 1).

A l'examen en microscopie électronique, on peut reconnaître dans le nucléole deux types de RNPs : les éléments granulaires et fibrillaires.

Granules et fibrilles sont dispersés dans un réseau de chromatine intra-nucléolaire. Ce corps nucléolaire est entouré d'une masse importante de chromatine périnucléolaire, à structure condensée (GRANBOULAN et GRANBOULAN -1964-).

Bien que les événements moléculaires impliqués dans la synthèse, la maturation et le transport des éléments prérribosomiques dans le nucléole aient fait l'objet de nombreuses études, aucun système de fractionnement des éléments nucléolaires structuralement définis n'avait été décrit, permettant d'approfondir l'étude des relations structure-fonction au niveau de cet organelle.

C'est dans ce but que nous avons entrepris de mettre au point un système de déstructuration contrôlée de nucléoles isolés. Dans une étude préliminaire, nous avons étudié systématiquement les réponses de l'organisation nucléolaire à des modifications de concentration en ion Mg^{++} , cet ion divalent jouant un rôle particulièrement important dans le maintien et les changements des structures RNPs et DNPs.

Les résultats de l'étude ultrastructurale sont exposés dans ce chapitre. Cette partie du travail a été effectuée en collaboration étroite avec le Professeur SIMARD (Université de Sherbrooke - Canada).

RESULTATS :

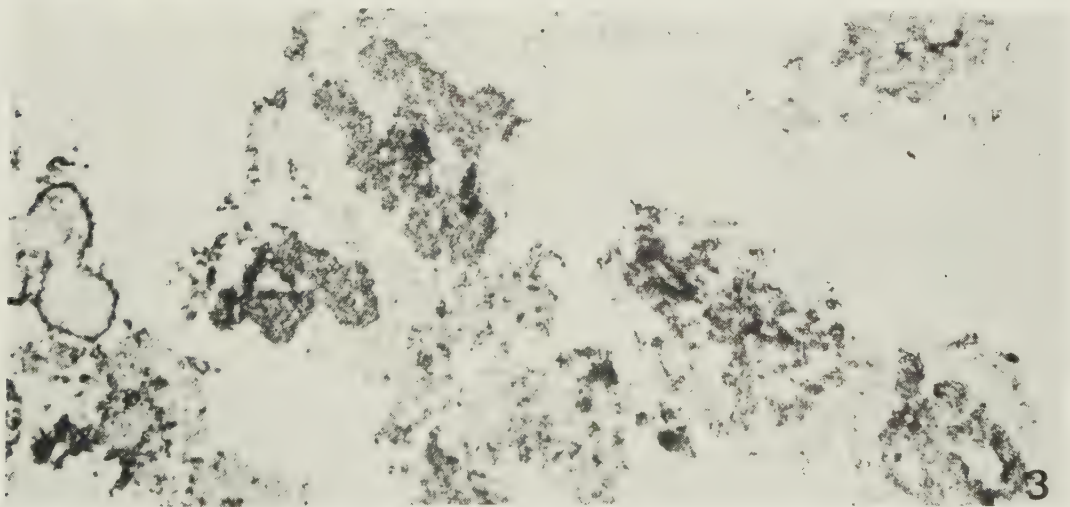
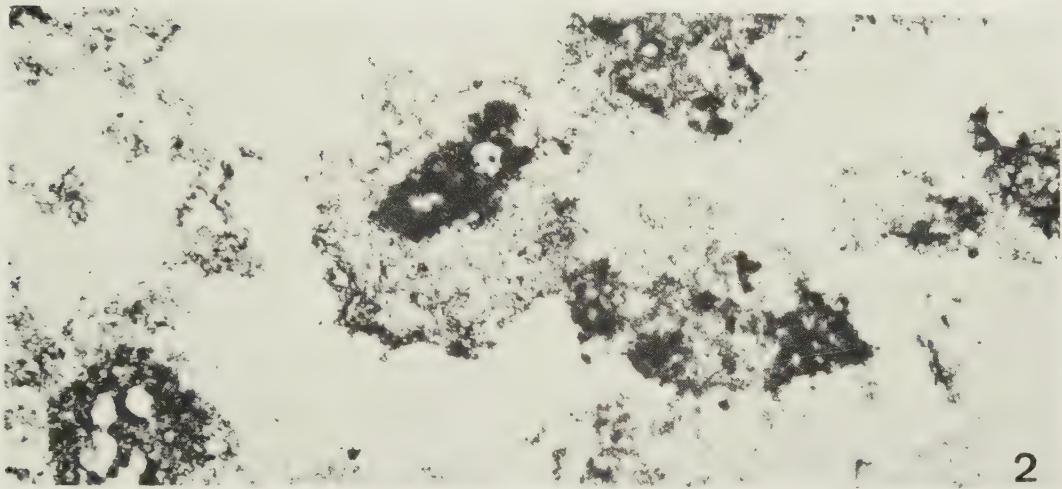
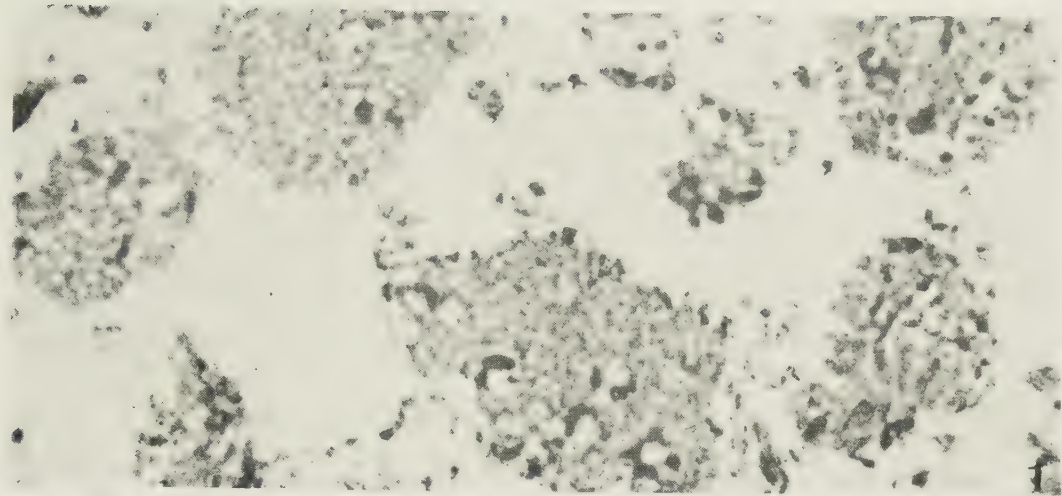
L'étude présentée ici a été réalisée à partir de cellules d'hépatome ascitique du rat. Des résultats tout à fait comparables ont pu être obtenus sur les cellules CHO.

Techniques :

Des parties aliquotes de suspension nucléolaire (avant ou après l'étape de sonication) ou des sous-fractions $C_{1.5}$, $C_{2.5}$ et $S_{2.5}$ sont fixées, dans le tampon Sörensen, par le glutaraldéhyde à 2,5 % pendant 30 minutes, puis par l'acide osmique à 2 % pendant 1 heure, avant d'être enrobées dans l'Epon 812. Les coupes fines sont colorées à l'acétate d'uranyle à 0,5 %, pendant 10 minutes, puis au citrate de plomb pendant 5 minutes. La coloration négative est effectuée par l'acétate d'uranyle à 2 % non tamponné - pH 4 à 5 (BRUSKOW et al. - 1968- MATHIAS et al. -1964-).

1) Effets de l'ion Mg^{++} sur les nucléoles isolés.

L'intégrité structurale du nucléole est étroitement dépendante de la concentration en ion Mg^{++} . Dans nos préparations nucléolaires (1ère partie, chap. 1), une concentration finale de 3 mM est optimum pour une bonne préservation de l'organisation ultrastructurale du nucléole au terme



FIGURES 1, 2 et 3 : Nucléoles isolés, observés avant sonication.

- 1) $Mg^{++} = 3 \text{ mM}$. Tous les nucléoles conservent une structure compacte et gardent leur architecture normale. X 15 000.
- 2) $Mg^{++} = 1 \text{ mM}$. On voit nettement un gonflement important de la chromatine périnucléolaire (x 10 000).
- 3) $Mg^{++} = 0$. Le gonflement de la chromatine nucléolaire est maximum tandis que le corps nucléolaire, où restent visibles les RNPs fibrillaires et granulaires, est peu modifié (x 10 000).

de leur isolement.

Dans ces nucléoles isolés, les granules et fibrilles sont dispersés dans un réseau de forte densité électronique entouré de chromatine périnucléolaire. Cette chromatine se trouve dans un état condensé et se compose, tout comme la chromatine condensée associée à la membrane nucléaire, de fibres de 200 à 250 Å étroitement entassées (fig. 1).

Quand les nucléoles isolés sont remis en suspension pendant 30 minutes environ dans un milieu à basse force ionique ne contenant que 1 mM ou moins en ion Mg^{++} , un gonflement très important du nucléole peut être observé : il est d'autant plus marqué que la concentration en ion Mg^{++} est plus basse. Ces modifications sont déjà détectables à 1 mM (fig. 2) mais deviennent beaucoup plus nettes à 0,1 mM en ion Mg^{++} ou encore en l'absence d'ion Mg^{++} (fig. 3).

Le gonflement observé correspond essentiellement à une décompaction complète de la chromatine périnucléolaire, qui est maximum en l'absence d'ion Mg^{++} .

La largeur des fibres de chromatine est alors nettement réduite (80 à 100 Å) : elles^{restent} cependant en association lâche avec le nucléole. Les RNPs fibrillaires et granulaires n'apparaissent pas modifiés bien qu'on puisse parfois observer une sortie d'éléments ressemblant à des RNPs nucléolaires.

Si la concentration en ion Mg^{++} de la suspension de nucléoles isolés est portée à 3 mM, on constate la réversibilité de ces modifications ultrastructurales : des masses de chromatine condensée réapparaissent à la périphérie du nucléole avec une distribution générale semblable à celle qui était initialement observée.

Nous avons examiné si ces changements de conformation s'accompa-

Tableau I : EXTRACTION DES CONSTITUANTS NUCLEOLAIRES EN
FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ION Mg^{2+} .

	Mg^{2+}	3 mM	1 mM	0,5 mM	0
SANS SONICATION	ADN	0	2	5	10
	ARN	0	2	1	5
	Protéines	0	2	3	8
AVEC SONICATION	ADN	34	76	86	100
	ARN	17	28	42	100
	Protéines	25	60	72	90

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'ADN, de l'ARN ou des protéines des nucléoles isolés qui se retrouvent dans la fraction Surnagent I500g.

gnaient d'une sortie de matériel nucléolaire. Il n'y a, en fait, dans ces conditions, qu'une libération quantitativement négligeable d'ADN, d'ARN et de protéines nucléolaires (tableau 1). Pour tenter de dissocier de façon plus poussée les structures nucléolaires, nous avons associé à l'effet de basses concentrations en ion Mg^{++} l'utilisation d'oscillations soniques.

2) Effet de la sonication à différentes concentrations en ion Mg^{++} .

Divers facteurs peuvent contrôler le degré de dissociation d'éléments soumis à l'effet d'oscillations soniques : puissance et durée de la sonication, volume de la suspension traitée, forme du récipient, concentration des éléments étudiés. Cependant, les conditions expérimentales que nous avons définies (chapitre précédent) permettent d'obtenir des effets très reproductibles. Des modifications légères de l'un ou l'autre des divers facteurs n'introduisent pas de modifications sensibles dans la dissociation et le fractionnement ultérieur, que ce soit qualitativement ou quantitativement. (puissance : de 80 à 120 W ; durée de 3 à 30 secondes ; volume : 0,75 à 1,5 ml ; concentration des nucléoles isolés : 6×10^6 à 5×10^8 /ml).

Après sonication à 3 mM en ion Mg^{++} , on n'observe pas de modification sensible de l'ultrastructure des nucléoles isolés.

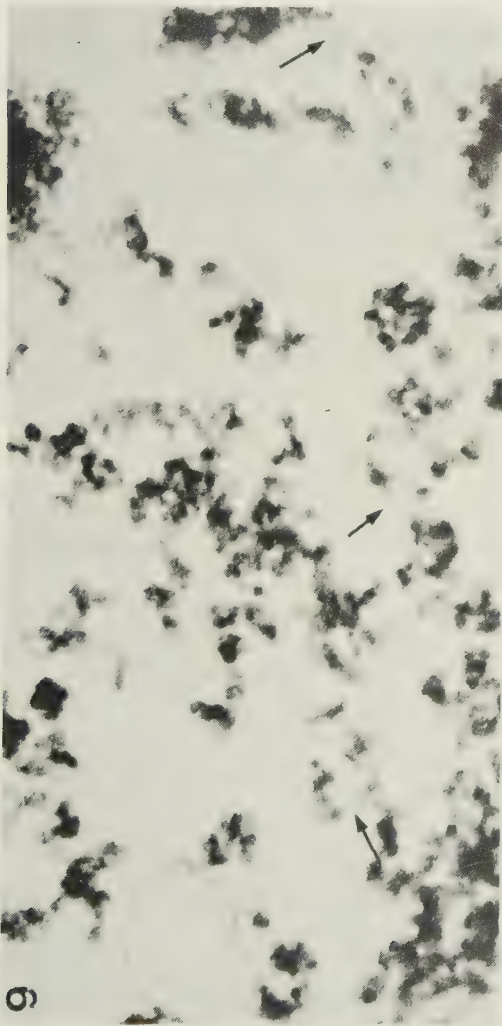
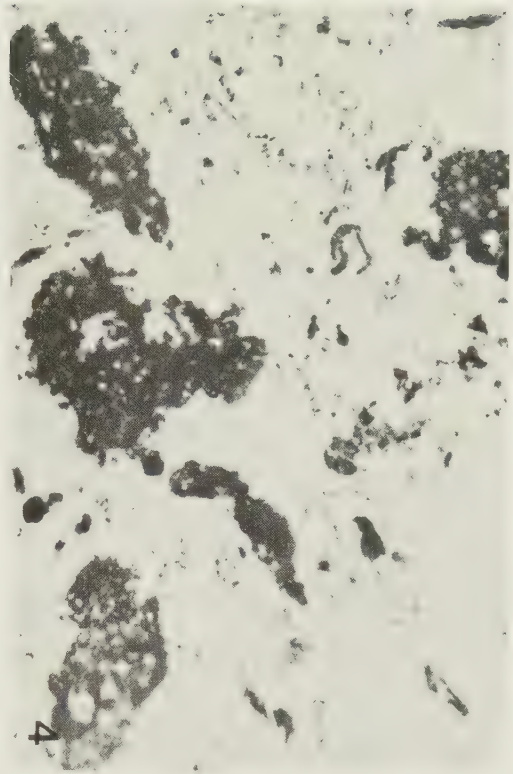
Par contre, à 1 mM, la sonication provoque une dissociation partielle des nucléoles en "corps nucléolaires"-contenant les éléments RNPs granulaires et fibrillaires- et en masses fibreuses fragmentées, de dimensions variables, à forte densité électronique (fig. 4). A 0,1 mM (fig. 5) ou en l'absence d'ion Mg^{++} (fig. 6), le nucléole est dissocié extensivement et on ne peut plus reconnaître de corps nucléolaire structuré.

FIGURES 4, 5 et 6 : Nucléoles isolés, observés après sonication.

4) $Mg^{++} = 1 \text{ mM}$. On reconnaît des corps nucléolaires, compacts et de dimensions importantes, ainsi que des masses fragmentées, de taille variable, à forte densité électronique. $\times 12\ 000$.

5) $Mg^{++} = 0,1 \text{ mM}$. Le corps nucléolaire est généralement dissocié de façon plus poussée. Certains d'entre eux, de dimensions réduites, restent visibles (flèche). On peut identifier des groupements de particules $\times 12\ 000$.

6) $Mg^{++} = 0$. Les groupements de particules apparaissent reliés par un filament (flèche) qui mesure généralement de 80 à 100 Å. $\times 60\ 000$.



Des grappes de particules reliées par un mince filament fibrillaire sont aisément identifiables et alternent avec des masses fibreuses de dimensions relativement importantes (fig. 5). Cependant, en l'absence complète d'ion Mg^{++} (fig. 6), la plupart de ces masses fibreuses sont dissociées et on ne peut identifier que les grappes de particules, reliées par le filament d'environ 80 à 100 Å de diamètre.

3) Fractionnement des éléments nucléolaires dissociés.

Dans la série de suspensions nucléolaires traitées par sonication en présence de concentrations décroissantes en ion Mg^{++} (fig. 4, 5, 6), trois types principaux d'éléments nucléolaires ont été identifiés :

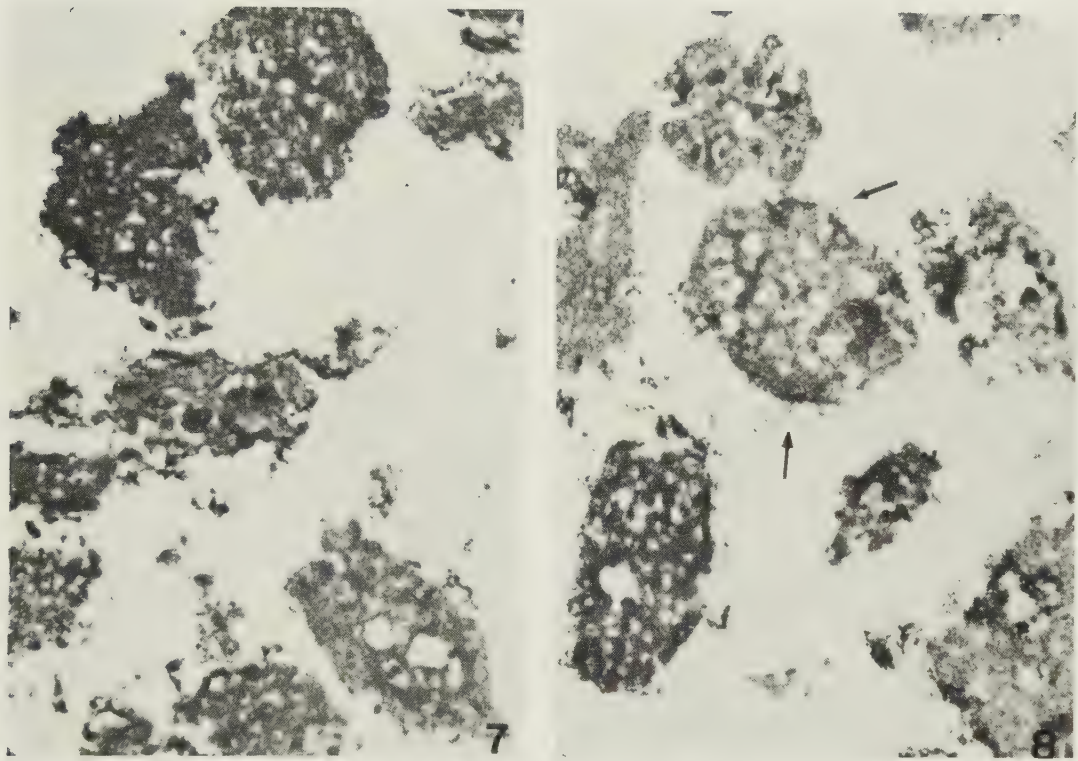
- des corps nucléolaires, à peu près intacts à 3 mM et légèrement dissociés à 1 mM ou plus nettement dissociés à 0,5 mM
- des masses fibreuses denses de tailles variables qui n'apparaissent généralement qu'en présence de faibles concentrations en ion Mg^{++} (0,1 et 0,5 mM)
- des groupements de particules reliées par un filament, qui apparaissent essentiellement en l'absence d'ion Mg^{++} .

Un fractionnement préliminaire de ces divers types d'éléments a été réalisé par centrifugation différentielle, selon le schéma décrit dans le chapitre précédent.

L'étude en microscopie électronique des trois fractions $C_{1,5}$, C_{25} et S_{25} a mis en évidence leur homogénéité du point de vue ultrastructural.

Fraction $C_{1,5}$.

A 3 mM, cette fraction est constituée en fait d'éléments tout à fait ressemblants aux nucléoles isolés et non traités, décrits fig. 1.



FIGURES 7 , 8 : Fractions subnucléolaires isolées $C_{1,5}$.

7) Obtenue de nucléoles traités à $Mg^{++} = 1 \text{ mM}$ (x 12 000).

8) Obtenue de nucléoles traités à $Mg^{++} = 0,5 \text{ mM}$ (x 12 000)

Dans les deux cas, le corps nucléolaire apparaît débarrassé de la chromatine périnucléolaire associée. Seules quelques fibres de chromatine restent parfois visibles (flèche).

Le culot 1 500 g obtenu après dissociation à 1 mM est constitué de corps nucléolaire dont l'architecture est relativement bien préservée (fig. 7) mais dont la chromatine périnucléolaire a été plus ou moins complètement enlevée.

A 0,5 mM (fig. 8), l'enlèvement de la chromatine est encore plus marqué et de larges lacunes apparaissent dans les corps nucléolaires, indiquant un départ de chromatine intranucléolaire.

Pour des concentrations inférieures à 0,5 mM, on ne retrouve pratiquement plus de matériel dans cette fraction $C_{1,5}$.

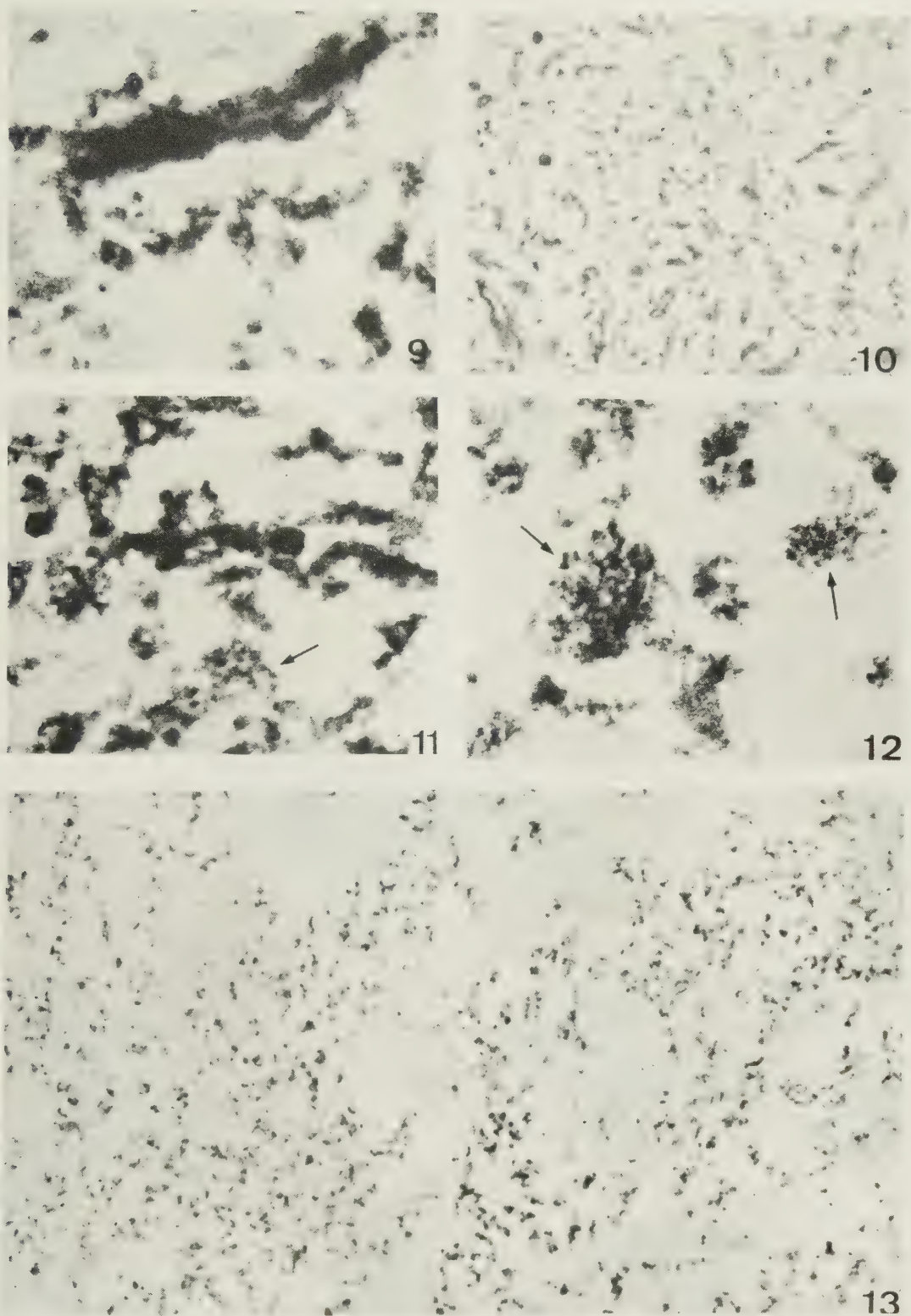
Fraction C_{25} .

Quand cette fraction est obtenue à 1 mM ou à 0,5 mM en ion Mg^{++} , on observe la présence de masses fibreuses denses, de dimensions variables. Parfois, on peut identifier, à la périphérie de ces masses, des éléments particuliers (fig. 9 et 10). A 0,1 mM, cette fraction se compose de petites masses fibreuses allongées et de divers types d'éléments particuliers étroitement associés (fig. 11).

En l'absence complète d'ion Mg^{++} , des groupes de particules nucléolaires et des masses fibreuses de dimensions inférieures associées avec des éléments particuliers restent visibles (fig. 12). Le diamètre moyen des particules est de l'ordre de 200 Å.

Fraction S_{25} .

Cette fraction ne contient que peu de matériel nucléolaire au-delà de 1 mM en ion Mg^{++} . Sa composition varie essentiellement du point de vue quantitatif, quand la concentration en ion Mg^{++} est réduite à 0,5 mM, 0,1 mM ou à 0. Cette fraction est essentiellement composée, d'une manière très homogène, de particules en grappes, d'environ 200 Å de diamètre, se



FIGURES 9 à 12 :

Fractions subnucléolaires isolées C₂₅.

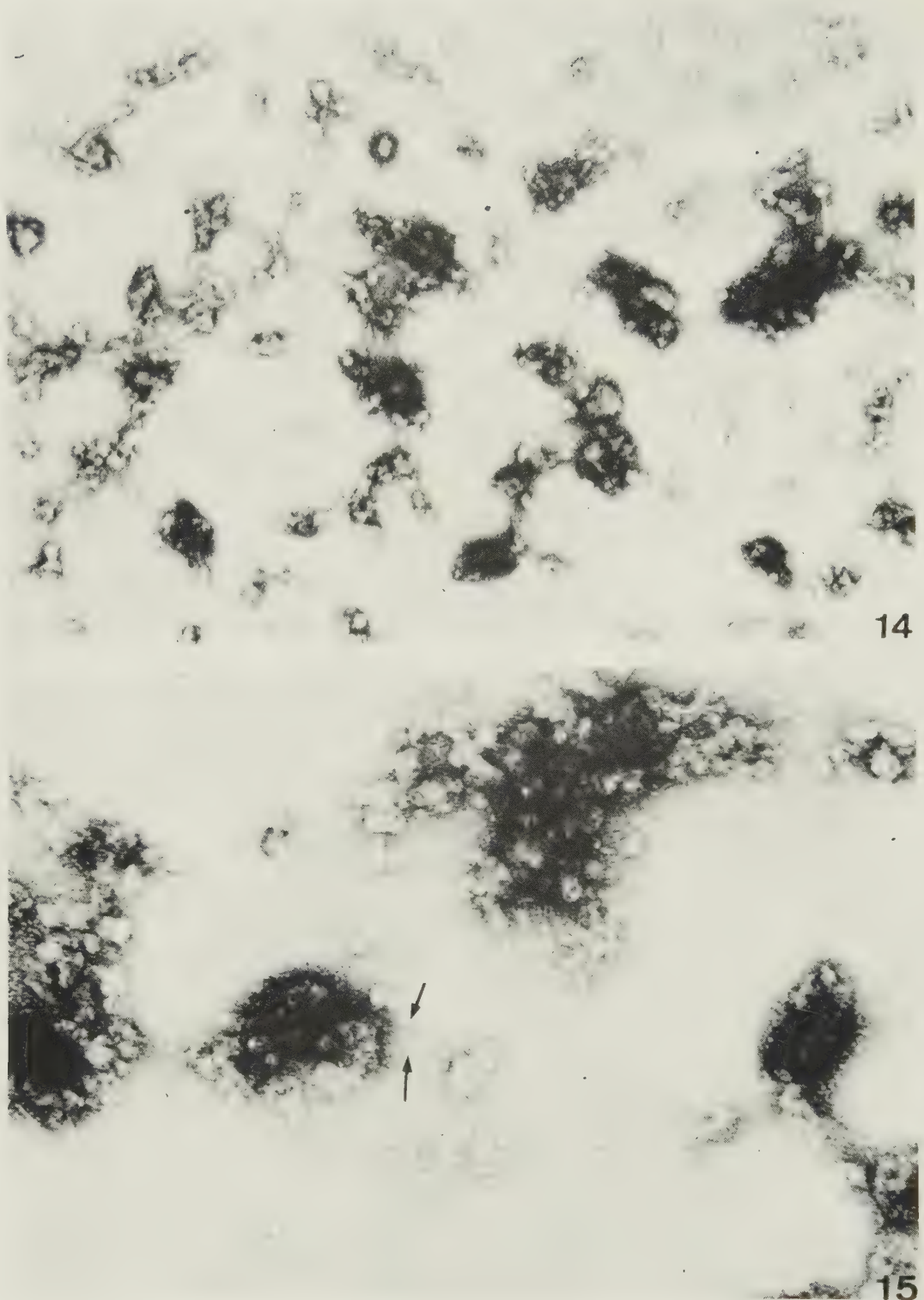
9 et 10 : Obtenues de nucléoles traités à 1mM en Mg^{++} (fig. 9 $\times 60\ 000$) ou à 0,5 mM en Mg^{++} (fig. 10 $\times 12\ 000$). Les masses fibreuses à forte densité électronique ont des dimensions variables.

11 et 12 : Obtenues de nucléoles traités à 0,1 mM en Mg^{++} (fig. 11 $\times 60\ 000$) ou en l'absence de Mg^{++} (fig. 12 $\times 60\ 000$). On peut voir des éléments de type particulaire (flèches) qui, dans la figure 12, apparaissent groupés.

FIGURE 13 : Fraction subnucléolaire isolée S₂₅, obtenue de nucléoles

traités en l'absence de Mg^{++} .

Des groupes de particules d'environ 200 Å de diamètre, se répartissent le long d'un filament de 80 à 100 Å d'épaisseur ($\times 24\ 000$).



FIGURES 14 et 15 : Fraction subnucléolaire isolée S_{25} , obtenue de nucléoles traités en l'absence de Mg^{++} .

Observation en coloration négative. Les particules d'environ 200 Å de diamètre sont soit groupées en amas, soit réparties le long d'une structure filamenteuse de 80 à 100 Å (fig. 14, x 60 000). A un grossissement supérieur (fig. 15, x 120 000), on distingue parfois des filaments de 40 à 50 Å (flèche).

répartissant généralement le long d'un mince filament (fig. 13). L'observation est effectuée par coloration négative. Les dimensions du filament qui relie les particules sont variables et il est parfois difficile de le mettre en évidence quand des groupements importants de particules sont présents : en général, cependant, on peut identifier dans la plupart des zones observées une fibre de base dont le diamètre est de l'ordre de 100 Å (fig. 14). A plus fort grossissement, on peut parfois déceler des brins plus fins, d'environ 40 à 50 Å, localisés autour de groupes de particules; ils pourraient correspondre à un ADN plus ou moins dénudé (fig. 15).

DISCUSSION.

L'effet combiné de basses concentrations en ion Mg^{++} et d'oscillations soniques a permis une dissociation contrôlée et une séparation préliminaire de sous-structures nucléolaires.

Le traitement des nucléoles isolés par de basses concentrations en ion Mg^{++} provoque une dispersion de la chromatine associée au nucléole. Cet effet a été utilisé pour réaliser une dissociation plus poussée par l'utilisation d'oscillations soniques. Il apparaît ainsi que la chromatine nucléolaire joue un rôle essentiel dans l'organisation structurale du nucléole.

La réduction de la concentration en ion Mg^{++} ne provoque par elle-même aucune modification sensible de la composition macromoléculaire du nucléole (voir tableau 1) : les changements de configuration observés au niveau de l'appareil nucléolaire semblent pouvoir être attribués essentiellement à des modifications d'interactions électrostatiques.

A 3 mM en ion Mg^{++} , la chromatine associée au nucléole se compose de fibrilles de 200 à 250 Å de large qui sont condensées en masses relativement importantes qui se répartissent à la périphérie et à l'intérieur du nucléole.

En l'absence d'ion Mg^{++} , il se produit un déplacement et une dispersion des fibrilles de chromatine qui aboutissent à l'apparition d'une fibre uniforme de 80 à 100 Å de largeur. Les changements de configuration des fibres de chromatine, d'un état condensé à un état dispersé, sont ici contrôlés par la concentration en ion divalent.

Ce résultat est à rapprocher des observations de BRASH et al. (1971), lors d'une étude de l'effet d'ions métalliques divalents sur la chromatine nucléaire. Il est aussi à rapprocher des conclusions de BRAM et RIS (1971) qui considèrent la fibre de chromatine de 250 Å de diamètre

comme résultant d'un repliement (ou d'une compaction) d'une super-hélice, sous l'effet de cations divalents.

C'est l'effet de la sonication qui permet une dissociation plus ou moins complète des constituants du nucléole dont la configuration générale a été modifiée selon la concentration en ion Mg^{++} .

Il est remarquable que la fraction S_{25} obtenue en l'absence d'ion Mg^{++} , renferme 95 % de l'ADN et environ 90 % de l'ARN et des protéines nucléolaires (voir chapitre précédent). On peut donc considérer que les figures 13 et 14 représentent les structures de base de l'organisation nucléolaire, après une dispersion importante : grappes de particules d'environ 250 Å reliées par un mince filament : on peut admettre que ces éléments correspondent aux particules RNPs associées à une fibre de chromatine.

On peut cependant récupérer, en l'absence d'ion Mg^{++} , une faible proportion d'éléments nucléolaires dans la fraction C_{25} . Ces éléments se présentent sous forme d'amas de particules ressemblant étroitement aux RNPs de type granulaire décelables *in situ*.

Il se peut que ces éléments représentent des particules RNPs libérées des complexes chromatine-RNPs qui se retrouvent dans S_{25} .

Entre 0,1 et 1 mM en ion Mg^{++} , la part de matériel nucléolaire retrouvé dans la fraction C_{25} est maximum. Pour ces concentrations, on peut reconnaître à la fois (fig. 9, 10, 11) des masses fibreuses à forte densité électronique et des particules granulaires. Ces structures présentent de grandes analogies avec les zones fibrillaires et granulaires du nucléole *in situ*. On peut considérer que les masses fibreuses à forte densité électronique sont des associations de chromatine et de RNPs de type fibrillaire.

Les résultats qui viennent d'être décrits permettent d'envisager dès maintenant une étude fine, au niveau moléculaire, des constituants nucléolaires essentiels, ultrastructuralement et topographiquement définis : chromatine péri- et intra-nucléolaire, RNPs de types fibrillaire et granulaire. L'analyse et le fractionnement plus poussé des divers types d'éléments qui ont été isolés peut permettre de relier les caractéristiques ultrastructurales de l'organisation nucléolaire à ses diverses fonctions biochimiques.

TROISIEME PARTIE

ORGANISATION ULTRASTRUCTURALE ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE

DE COMPLEXES CHROMATINE-RNP_s ISOLÉS DES RÉGIONS NON-NUCLEOLAIRES

DU NOYAU.

Des éléments extraits des régions non-nucléolaires du noyau ont été caractérisés par une étude corrélative biochimique et ultrastructurale. Au niveau de ces structures complexes isolées, il a été possible de reconnaître des arrangements supra-particulaires dont l'organisation ressemble étroitement à celle de certaines zones nucléaires in situ.

On peut identifier, en particulier, des RNPs morphologiquement définies (fibrilles et granules périchromatiniens) associés à des régions chromatinienne caractéristiques. L'étude autoradiographique a permis d'établir que l'ARN Hn nouvellement synthétisé se localise essentiellement au niveau des fibrilles périchromatiniens.

Une dissociation partielle de ces complexes structurés a été obtenue par enlèvement de la majeure partie de la chromatine. Dans ces conditions, une faible part de l'ADN reste lié au réseau RNP non dissocié, et peut avoir un rôle particulier dans la biosynthèse et la maturation de l'ARN Hn.

INTRODUCTION :

La plupart des mécanismes qui contrôlent la maturation de l'ARN messager chez les eucaryotes restent encore largement hypothétiques. Cependant, plusieurs faits apparaissent maintenant bien établis. Une classe d'ARN nucléaire à haute masse molaire et de taille hétérogène (ARN Hn) qui se marque rapidement et qui a une composition en base voisine de celle de l'ensemble de l'ADN global (SCHERRER et al.-1963, 1965, 1966- GEORGIEV et al.-1963- WARNER et al. -1966-) a des caractéristiques de précurseur de l'ARN messager cytoplasmique (DARNELL et al. -1971- IMAIZUMI et al.-1973-). La majeure partie de l'ARN Hn est dégradée dans le noyau et n'apparaît pas dans le cytoplasme (SCHERRER et al.-1963, 1965-). Des travaux récents ont montré cependant que l'ensemble des molécules d'ARN Hn ne pouvaient être considérées simplement comme des précurseurs directs de l'ARN messager (PERRY et al.-1974- PRICE et al.-1974-).

Des études cytologiques (MONNERON et BERNHARD -1969- MILLER et BAKKEN -1972-) et biochimiques (SAMARINA et al.-1968- STEVENIN et al.-1972, 1974- PEDERSON -1974-) ont établi que l'ARN Hn se trouve sous forme de par-

ticules RNPs. La caractérisation biochimique, et notamment l'étude des protéines de ces RNPs isolées par diverses méthodes, a été entreprise par différentes équipes (SAMARINA, 1968 - STEVENIN, 1972-1974- PEDERSON -1974).

L'étude ultrastructurale du noyau en interphase (MONNERON et BERNHARD -1969-) a montré que les divers types morphologiques de RNPs, comme les fibrilles et granules périchromatiniens et granules interchromatiniens (GRANBOULAN et BERNHARD -1961- BERNHARD et GRANBOULAN -1963-) se répartissent topographiquement *in situ* d'une manière caractéristique en relation possible avec un rôle fonctionnel bien déterminé.

C'est pour tenter de mettre en évidence des corrélations entre les caractéristiques biochimiques et ultrastructurales des RNPs nucléaires et leur organisation spatiale *in situ* que nous avons engagé le présent travail. Plus particulièrement, nous avons entrepris d'examiner s'il était possible de reconnaître, à la fois dans les régions nucléolaires et non-nucléolaires du noyau, des types d'organisation homologues entre la chromatine active et les produits transcriptionnels précoces.

Nous avons défini une méthode permettant d'isoler du noyau des complexes entre chromatine et éléments RNPs dont l'organisation ultrastructurale apparaît bien préservée. L'étude de ces complexes isolés peut permettre de préciser certains aspects de l'organisation de régions chromatinien-nes activement transcrites et de caractériser divers processus impliqués dans la maturation de l'ARN Hn. Elle a déjà permis d'établir que les RNPs dits "fibrilles périchromatiniens" représentent l'état morphologique de l'ARN Hn nouvellement synthétisé, comme l'avait suggéré une étude *in situ* par autoradiographie (FAKAN et BERNHARD -1971-).

Cette partie de notre travail a été effectuée en étroite collaboration avec le Docteur Edmond PUVION, du laboratoire de Microscopie Electronique de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer à VILLEJUIF, qui a été largement responsable de la réalisation et de l'interprétation des résultats de l'étude ultrastructurale.

RESULTATS:

I. DESCRIPTION DU MODE DE DISSOCIATION ET DE FRACTIONNEMENT

Les marquages des cellules et l'isolement des noyaux sont effectués comme décrit précédemment (1ère partie, chap. 1). La rupture des noyaux est réalisée par sonication à basse force ionique, en présence d'ion Mg^{++} et de Ficoll qui favorise la dispersion de la chromatine (ZALTA

Tableau I : SCHEMA DE FRACTIONNEMENT

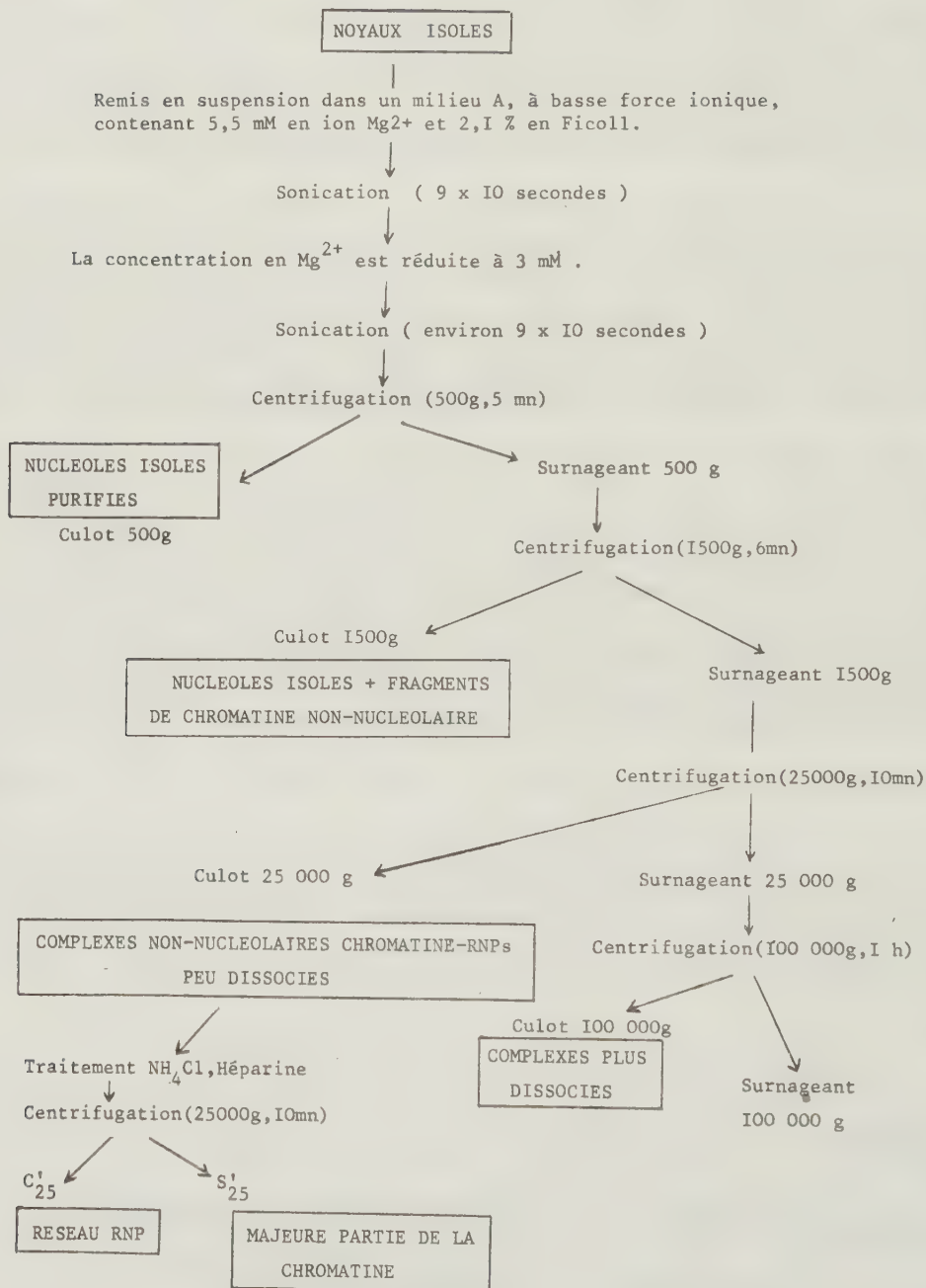


Tableau 2 : REPARTITION DE L'ADN ET DE L'ARN
DANS LES SOUS-FRACTIONS NUCLEAIRES .

Des cellules C.H.O. sont doublement marquées par 4 heures d'incorporation de thymidine (^3H), à 1 $\mu\text{C/ml}$, et d'uridine (^{14}C), à 0,1 $\mu\text{C/ml}$. Le fractionnement des éléments nucléaires est effectué selon le tableau I . La radioactivité TCA-précipitable est mesurée sur des parties aliquotes de chaque sous-fraction nucléaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'ADN et de l'ARN total des noyaux isolés.

FRACTION	NUCLEOLES ($\text{C}_{0,5} + \text{C}_{1,5}$)	C_{25}	C_{100}	S_{100}
ARN (%)	42	34	23	1
ADN (%)	15	57	26	2

et al.-1971-). Les constituants nucléaires plus ou moins dissociés sont alors séparés par une série de centrifugations différentielles, selon le schéma présenté dans le tableau 1. Les nucléoles purifiés sont récupérés, sous forme de culot, par une centrifugation à 500 g. Les nucléoles restant dans le surnageant sont éliminés par une nouvelle centrifugation à 1 500 g. Des fractions extranucléolaires, dites C_{25} et C_{100} , sont obtenues à partir du surnageant 1 500 g par centrifugations successives à 25 000 et 100 000 g.

La répartition de l'ARN et de l'ADN dans les différentes sous-fractions nucléaires a été déterminée, pour des cellules CHO, après 4 heures de marquage par l'uridine (^{14}C) et par la thymidine (3H). Les résultats (voir tableau 2) représentent une moyenne de trois déterminations. Cette répartition est reproductible; elle n'est pas modifiée de façon significative quand le fractionnement est réalisé sur des cellules qui ont été marquées pendant un temps plus court (15 minutes au lieu de 4 heures).

La majeure partie de l'ARN et de l'ARN nucléaires non-nucléolaires sont retrouvés au niveau des éléments sédimentant le plus rapidement (C_{25}), le restant étant récupéré presque exclusivement dans la fraction C_{100} . La fraction S_{100} ne contient que 2 % environ des acides nucléiques initialement présents dans le noyau isolé.

2. ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES COMPLEXES CHROMATINE-RNPs ISOLES

Techniques ultrastructurales.

Fixation. Les culots sont fixés (pendant 30 à 60 minutes) par le glutaraldéhyde (à 1,6 % dans le tampon Sörensen, 0,01 M pH 7,3). Chaque fois qu'un enrobage ultérieur dans le glycolméthacrylate (GMA) est prévu (pour permettre des digestions enzymatiques des coupes), le temps de fixation est réduit à 10 minutes.

Colorations classiques : Les culots fixés par le glutaraldéhyde sont enrobés dans l'Epon après déshydratation par l'éthanol, sans fixation ultérieure par l'acide osmique. Dans le cas où les éléments fixés restent dispersés dans le tampon de fixation, même après une centrifugation prolongée, il est possible de les récupérer dans une gouttelette d'azur à 3 % (à 45 °) avant de procéder à la déshydratation. Par les digestions enzymatiques, les culots sont enrobés dans le GMA selon la technique de LEDUC et BERNHARD (1967). Les coupes fines sont colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

Colorations préférentielles : Les coupes réalisées sur les éléments enrobés dans l'Epon sont traitées successivement par l'acétate d'uranyle, l'EDTA et le citrate de plomb, selon la méthode de BERNHARD (1969).

Coupes à congélation : Une partie aliquote des fractions étudiées est homogénéisée avec le "tissue-tek" (BENICHO et RYTER -1973-), puis congelée et découpée à l'ultramicrotome SORVAL MT 2 B spécialement équipé. Les coupes sont étalées sur une colution de diméthylsulfoxyde (à 50 % dans l'eau) puis transférées dans l'eau à l'aide d'anneaux en plastique. Après montage sur des treillis recouverts de Formvar et de carbone, la coloration préférentielle est effectuée selon la technique modifiée (PUVION et BERNHARD -1975-).

Digestions enzymatiques : Elles sont effectuées sur les coupes fines obtenues, soit après congélation, soit après enrobage dans le GMA. Dans les deux cas, les coupes sur les anneaux de plastique sont déposées et laissées pendant 1 à 5 heures sur une solution de RNAase (à 0,1 % dans l'eau à pH 7) ou de pepsine (0,5 % dans l'HCl 0,1 N). Après digestion enzymatique, la coloration finale est réalisée comme précédemment. Des coupes-témoins sont traitées dans des conditions strictement identiques mais en l'absence d'enzymes.

Autoradiographie : L'émulsion (ILFORD L 4) est appliquée sur chaque treillis, selon la technique décrite par HAASE et JUNG (1964). Les autoradiographies sont développées après 9 mois (2ème expérience sur les cellules CHO, fig. 5b et c) dans un révélateur contenant du phénidon. La coloration préférentielle pour les RNPs est ensuite appliquée sur les treillis après séchage.

Après double coloration classique, les deux fractions C_{25} et C_{100} paraissent très similaires. Elles sont constituées d'amas fibrillaires très colorés. On peut constater toutefois que ces masses semblent plus denses et de répartition irrégulière dans la fraction C_{25} tandis que leur distribution spatiale est plus régulière dans la fraction C_{100} . Que ce soit dans C_{25} ou dans C_{100} , on ne peut reconnaître de nucléoles ou de fragments nucléolaires.

Quand la méthode de coloration préférentielle est appliquée, la majeure partie du matériel fibrillaire est décolorée, ce qui caractérise un matériel chromatinien (BERNHARD -1969-). Dans ces conditions, des éléments RNPs apparaissent nettement. Ils sont constitués de fibrilles qui se localisent préférentiellement à la périphérie de la chromatine décolorée. Ils ont un diamètre d'environ 50 Å et s'enroulent souvent sur eux-mêmes en formant des structures granulaires. On peut identifier aussi un autre type de structures RNPs, des granules de 400 à 450 Å de diamètre, qui se trouvent soit à l'intérieur des masses de chromatine décolorée, soit en étroite association avec elles (fig. 3b et d).

3. ORIGINE EXTRA-NUCLEOLAIRE DES COMPLEXES CHROMATINE-RNPs

Il importait de vérifier au préalable l'origine extranucléolaire des éléments retrouvés dans ces fractions. Bien que l'examen en microscopie électronique n'ait pas permis d'identifier des nucléoles ou des fragments nucléolaires dans C_{25} et C_{100} , des contrôles biochimiques ont été effectués.

L'expérience décrite dans le tableau 3 a montré que 81 % des nucléoles présents initialement dans les noyaux isolés se retrouvaient dans les deux fractions dites "nucléolaires" ($C_{0,5} + C_{1,5}$) sous forme de structures bien préservées. Les nucléoles manquants (19 %) ne sont pas détectables dans C_{25} et C_{100} . On peut penser que ces nucléoles ont été plus ou moins largement dissociés au cours de la sonication et qu'ils se retrouvent alors, sous forme de fragments de différentes tailles, dans les diverses sous-fractions nucléaires. En conséquence, la valeur de 19 % doit représenter un maximum pour une éventuelle contamination des fractions non-nucléolaires par les nucléoles.

Sur ce point, un résultat plus déterminant est apporté par l'expérience décrite dans le tableau 4. Les cellules CHO ont été traitées

Tableau 3 : REPARTITION QUANTITATIVE DES NUCLEOLES ISOLEES

Les noyaux sont isolés à partir d'environ 2×10^8 cellules C.H.O..

La concentration précise de la suspension de noyaux isolés est déterminée au moyen d'un hématimètre avant l'étape de sonication. Le nombre moyen de nucléoles par noyau est obtenu après 169 déterminations sur la suspension nucléaire.

Le nombre de nucléoles récupérés dans les fractions $C_{0,5}$ et $C_{1,5}$ est déterminé de la même façon après remise en suspension dans le tampon TMK.

Nombre Moyen de Nucléoles par Noyau	1 , 75
Nombre Initial de Noyaux	$1 , 95 \times 10^8$
Nombre Initial de Nucléoles	$3 , 40 \times 10^8$ (100 %)
Nucléoles dans $C_{0,5}$	$1 , 20 \times 10^8$ (35 %)
Nucléoles dans $C_{1,5}$	$1 , 53 \times 10^8$ (46 %)
Nucléoles dans $C_{0,5} + C_{1,5}$	$2 , 73 \times 10^8$ (81 %)

Tableau 4 : INHIBITION DIFFERENTIELLE DE LA BIOSYNTHESE D'ARN
PAR L'ACTINOMYCINE D (0,1 μ g/ml) DANS LES DIFFERENTES
FRACTIONS SUBNUCLEAIRES .

Les cellules C.H.O. (10^8 environ) sont traitées par l'actinomycine D (0,1 μ g/ml) pendant 10 minutes avant d'être marquées par incorporation d'uridine (^3H) pendant 15 minutes, à 2 $\mu\text{C/ml}$. Un lot égal de cellules témoins sont marquées dans les mêmes conditions, mais sans prétraitement par l'actinomycine.

Un autre lot de cellules C.H.O. a été marqué par 4 heures d'incorporation d'uridine (^{14}C), à 0,1 $\mu\text{C/ml}$. La moitié des cellules marquées au (^{14}C) est ajoutée à chaque lot de cellules marquées au (^3H) avant le fractionnement cellulaire de manière à contrôler la reproductibilité de la répartition de l'ARN dans les sous-fractions nucléaires.

La radioactivité TCA-précipitable est mesurée sur des parties aliquotes de chaque fraction.

Les résultats sont exprimés en variation relative de la quantité de radioactivité incorporée retrouvée au niveau de chaque fraction, pour les cellules traitées, par rapport aux cellules témoins.

NOYAUX ENTIERS	NUCLEOLES ($\text{C}_{0,5} + \text{C}_{1,5}$)	C 25000g	C 100000g
- 17 %	- 60 %	+ 7 %	+ 18 %

avant le marquage par incorporation d'uridine radioactive par de faibles doses d'actinomycine D, à une concentration qui permet d'inhiber spécifiquement la biosynthèse de l'ARN ribosomique (PERRY et KELLEY -1968-). On observe alors un effet différentiel très net entre le marquage des fractions "nucléolaires" ($C_{0,5}$ et $C_{1,5}$) et des fractions "non-nucléolaires" (C_{25} et C_{100}). Un pré-traitement de 10 minutes par l'actinomycine D (0,1 $\mu\text{g/ml}$) provoque une inhibition de 60 % du marquage de l'ARN dans les fractions "nucléolaires" tandis que le marquage des éléments "extra-nucléolaires" n'est pas réduit (au contraire, une légère augmentation peut être décelée).

4. ANALYSE DE L'ARN ISOLE DES COMPLEXES EXTRA-NUCLEOLAIRES

Une cinétique du marquage de l'ARN de ces fractions a été étudiée pour les cellules d'hépatome ascitique du rat et pour les cellules CHO.

Techniques.

L'ARN des fractions non-nucléolaires est extrait, selon la méthode décrite par PERRY et al. (1972 b) après un traitement à température ambiante par le SDS et par un mélange phénol-chloroforme, avec agitation vigoureuse au Vortex. Ce procédé permet une bonne récupération des ARNs qui contiennent des séquences poly (A).

Les ARNs retrouvés dans les phases aqueuses sont précipités par addition de deux volumes d'éthanol glacé en présence d'acétate de potassium 0,2 M (pH 5,1). Après plusieurs heures à -20°C , l'ARN précipité est récupéré par centrifugation, dissous dans le tampon HFI (NaCl 0,5 M ; Tris-HCl, 10 mM pH 7,4 ; MgCl_2 5 mM) et soumis à l'action de DNAase I (WORTHINGTON, électrophorétiquement pure) (50 $\mu\text{g/ml}$ à 0°C) pendant 20 minutes avant l'analyse par électrophorèse sur gel mixte de polyacrylamide-agarose dans les conditions décrites plus haut (1ère partie, chap. 1). Les valeurs de S sont déterminées par référence à l'ARN ribosomique cytoplasmique 18 et 28S.

Les profils de marquage de l'ARN extrait de la fraction C_{25} sont montrés fig. 1 pour les cellules d'hépatome ascitique du rat (1a) et pour les cellules CHO (1b).

Pour les cellules d'hépatome, après un marquage de 3 minutes par l'uridine (^3H), le profil de radioactivité est polydispersé dans une zone

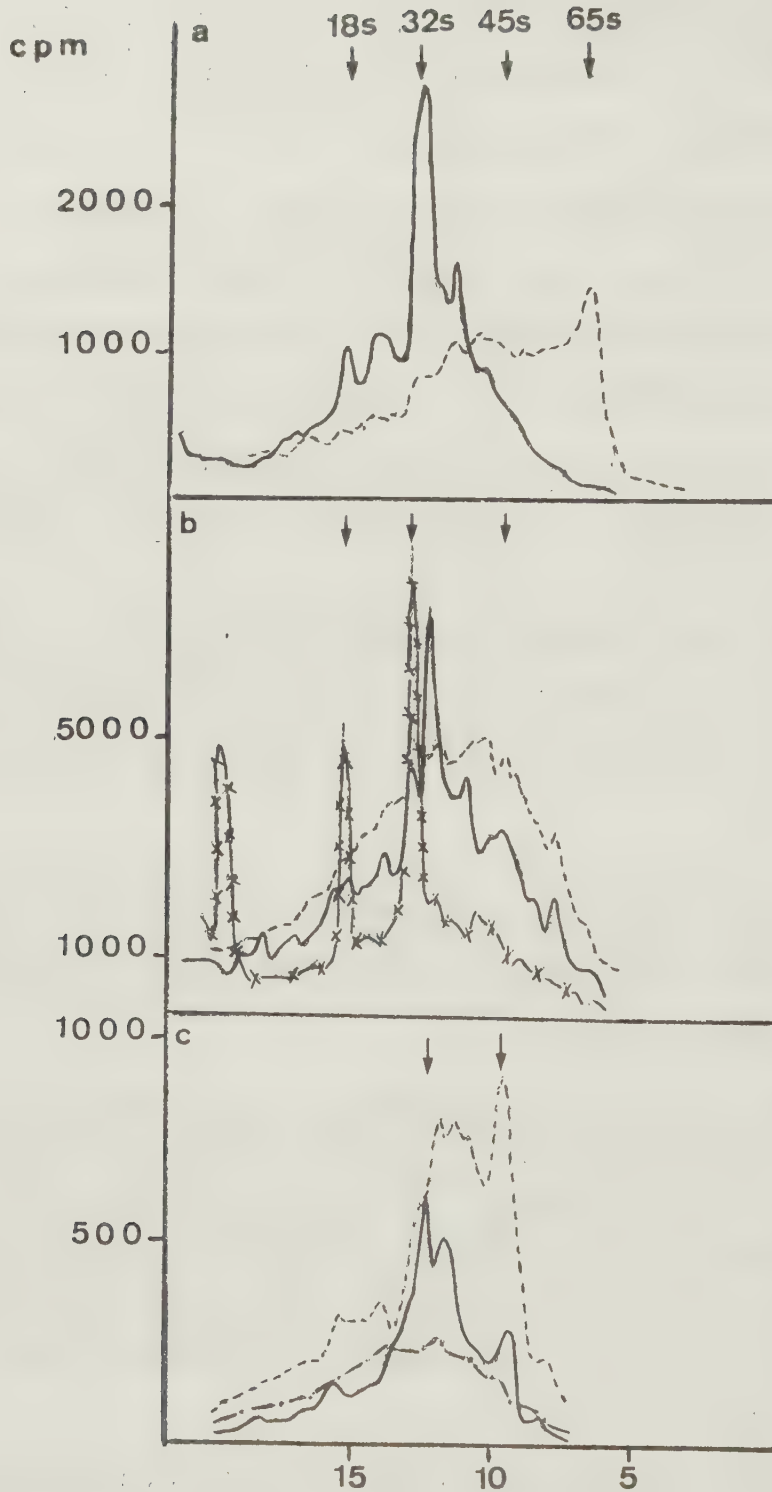


FIG. 1: Analyse de l'ARN de la fraction C₂₅

a) Cellules d'hépatome ascitique du rat. Les cellules sont marquées par l'uridine (³H) pendant 3 minutes (---) ou 3 heures (—). L'ARN extrait de la fraction C₂₅ est séparé par électrophorèse sur gel d'acrylamide-agarose.

b) Cellules C.H.O. Les cellules sont marquées pendant 15 minutes (---) ou 4 heures (—) ou 48 heures (—x—x—).

c) ARN nucléolaire. Les cellules C.H.O. sont marquées par l'uridine (³H) pendant 15 minutes (---) ou 4 heures (—). Le profil obtenu pour l'ARN nucléolaire marqué pendant 15 minutes après un traitement par l'actinomycine D (0,1 µg/ml) est également montré (—·—·—).

correspondant à des masses molaires élevées (20 à 70S). Un pic peut être identifié dans la région 65S. Quand les mêmes cellules sont marquées pendant 3 heures par l'uridine (^3H), le profil de marquage est déplacé vers les régions de masse molaire plus faible. La polydispersité est moins importante, des pics discrets apparaissent, dont la taille correspond à celle d'intermédiaires de la maturation ribosomique.

Pour les cellules CHO (fig. 1b), le temps de marquage le plus court qui ait été étudié jusqu'ici est de 15 minutes : le profil correspondant pour l'ARN extrait de C_{25} est polydispersé. Par rapport au profil correspondant à 3 minutes de marquage pour les cellules d'hépatome, on peut noter un léger déplacement vers les masses molaires plus faibles. Pour un marquage plus long (4 heures), des ARNs à taille discrète deviennent préférentiellement marqués, comme c'est le cas pour les cellules d'hépatome.

Un pré-traitement par l'actinomycine D ($0,1 \mu\text{g/ml}$) ne modifie pas le profil obtenu après 15 minutes d'incorporation. Ce traitement inhibe considérablement le marquage des fractions nucléolaires (tableau 4).

Les profils en radioactivité de l'ARN extrait des fractions nucléolaires sont montrés fig. 1c, à titre de contrôle.

On reconnaît les espèces moléculaires préribosomiques classiques. Le déplacement du marquage de la zone 45 à la zone 28S entre 15 minutes et 4 heures d'incorporation correspond au déroulement des processus de maturation de l'ARN préribosomique. L'effet inhibiteur du pré-traitement par l'actinomycine D sur le marquage de l'ARN nucléolaire apparaît très nettement (fig. 1c).

L'analyse de l'ARN extrait de la fraction non-nucléolaire C_{100} a également été effectuée (résultats non montrés).

Pour des temps de marquage très courts, les profils obtenus sont hétérodispersés mais les masses molaires moyennes sont généralement plus faibles que pour les fraction C_{25} . Pour des temps de marquage plus longs, les profils deviennent pratiquement superposables à ceux obtenus pour C_{25} .

Une étude préliminaire a montré que, malgré l'utilisation de la sonication pour effectuer la rupture des noyaux, l'ADN qui se retrouve dans la fraction C_{25} a une masse molaire relativement élevée (environ 2×10^7 g) alors que l'ADN récupéré dans C_{100} est nettement plus court.

5. FRACTIONNEMENT DES COMPLEXES CHROMATINE-RNPs.

L'observation en microscopie électronique a permis de reconnaître au niveau des éléments de la fraction C_{25} des types d'organisation qui ressemblent à des arrangements caractéristiques entre régions chromatiniennes et RNPs in situ. En vue de mieux définir l'organisation de ces éléments, nous avons entrepris de définir des conditions conduisant à une déstructuration partielle, pouvant aboutir ultérieurement à un fractionnement spécifique.

a) Une dissociation sélective du constituant chromatinien a été obtenue par l'action combinée d'une concentration élevée en NH_4Cl (0,75 M) - qui entraîne la libération de l'histone F 1 - et de l'héparine, un polyanion qui a une affinité élevée pour les protéines basiques.

Comme le montrent les résultats décrits dans le tableau 5, la fraction C'_{25} (culot 25 000 g récupéré après traitement des éléments de C_{25}) contient la majeure partie de l'ARN marqué (après 4 heures d'incorporation) initialement présent dans C_{25} . Par contre, l'ADN n'est plus retrouvé qu'en proportions faibles: le rapport ARN/ADN dans C'_{25} est trois fois supérieur à celui de C_{25} . Si le traitement NH_4Cl , Héparine est effec-

Tableau 5 : FRACTIONNEMENT DES ELEMENTS RETROUVES DANS C₂₅ .

La fraction C₂₅ est isolée de cellules C.H.O. après 4 heures de marquage par l'uridine (³H). Le culot obtenu est remis en suspension dans 1 ml de tampon AH (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 ,MgCl₂ 10mM NH₄Cl 0,75 M et Héparine 1%). Après 30 minutes de traitement à 0°C, avec de fréquents pipetages, la suspension est centrifugée à 25 000 g pendant 10 mn puis le pourcentage des acides nucléiques de C₂₅ récupérés dans le culot C'₂₅ est déterminé.

Dans une autre expérience, le traitement de la fraction C₂₅ par le tampon AH est effectué en présence de DNAase I (100 µg/ml)

	ARN	ADN	Traitement
Contenu de C' ₂₅ (en % de C ₂₅)	63	22	sans DNAase
	74	14	avec DNAase

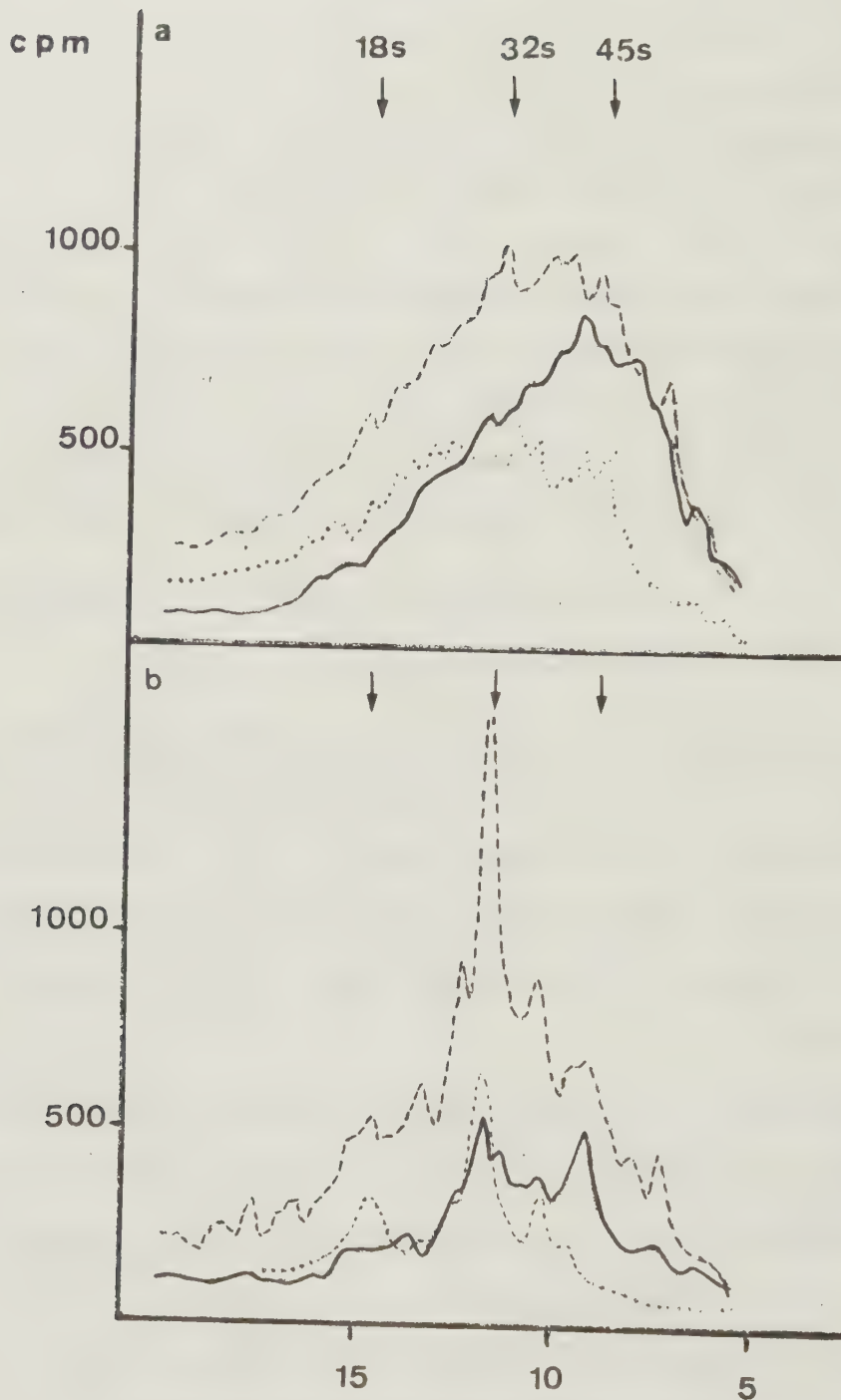


Fig. 2 :Analyse de l'ARN après le fractionnement de C_{25} par le traitement Héparine- NH_4Cl .

a) Les cellules C.H.O. sont marquées pendant 15 minutes par incorporation d'uridine (3H) après un traitement de 10 minutes par l'actinomycine D à 0,1 $\mu g/ml$. L'ARN est extrait des fractions C_{25} , C'_{25} et S'_{25} puis analysé par électrophorèse.

C_{25} (-----) ; C'_{25} (——) ; S'_{25} (- - - -).

b) id°, mais après 4 heures d'incorporation d'uridine (^{14}C) sans prétraitement par l'actinomycine.

tué en présence de DNAase I (100 µg/ml) la différence de répartition entre ADN et ARN est encore plus nette : le rapport ARN/ADN dans C'_{25} est alors 5 fois plus important que dans le C_{25} initial. Cependant, même dans ces conditions, une fraction non négligeable d'ADN reste liée aux structures complexes de nature RNP qui sédimentent rapidement (C'_{25}). Néanmoins, il est possible d'enlever exhaustivement cet ADN des structures RNPs de C'_{25} par un traitement ultérieur par la DNAase effectué à basse force ionique.

Si le temps de marquage de l'ARN est plus court (15 minutes, après un pré-traitement par l'actinomycine D à 0,1 µg/ml), on observe que la part d'ARN marqué (présent dans C_{25}) qui se retrouve dans C'_{25} devient plus importante (76 % au lieu de 63 % pour un marquage de 4 heures). Cette différence apparaît significative car l'étude de la répartition a été effectuée sur le même lot de cellules -marquées à la fois par incorporation d'uridine (3H) (15 minutes) et d'uridine (^{14}C) (4 heures)-.

Les ARNs retrouvés dans les deux sous-fractions C'_{25} et S'_{25} ont été analysés comme précédemment (fig. 2). Deux temps d'incorporation ont été étudiés, 15 minutes et 4 heures. Il apparaît globalement que les profils obtenus pour C'_{25} correspondent à des masses molaires plutôt plus élevées que pour S'_{25} . Ce résultat est à rapprocher de l'enrichissement de la fraction C'_{25} en ARN rapidement marqué (15 minutes) par rapport à un ARN marqué plus longtemps (4 heures), et des résultats de la cinétique de marquage (fig. 1) qui ont montré que l'ARN nouvellement synthétisé se retrouvait préférentiellement sous forme de molécules à haute masse molaire.

b) Etude ultrastructurale de la fraction C'_{25} .

La chromatine qui reste dans la fraction C'_{25} se présente sous forme de masses sphériques "amorphes" reliées les unes aux autres par un

Fig.3 : Etude ultrastructurale des fractions C_{25} (a,b) et C_{100} (c,d)
après double coloration classique(a,c) ou coloration préférentielle pour
les RNPs (b,d).

Les deux fractions sont composées essentiellement de masses fortement colorées de matériel de nature chromatinienne (chr) qui se décolore après traitement par l'EDTA. Les RNPs apparaissent soit sous forme de structures fibrillaires ($\longrightarrow$) étroitement associées à la chromatine décolorée soit sous forme de granules ($\dashrightarrow$) situés dans la chromatine ou à sa périphérie.

Grossissements : a), x12 000 ; b) x 50 000 ; c) x 30 000 ; d) x 30 000 .

Fig.4: Contrôles en cytochimie ultrastructurale sur la fraction C'_{25} .

a) Coloration préférentielle pour les RNPs : La chromatine apparaît sous forme de masses sphériques reliées par un réseau coloré de fibrilles ($\longrightarrow$) et de granules ($\dashrightarrow$) . x 50 000 .

b) Coloration préférentielle pour les RNPs sur C'_{25} après traitement par la DNAase. Les fibrilles et les granules restent bien visibles tandis que la plupart des masses de chromatine (chr) ont disparues. x50 000 .

c,d,e : Digestions enzymatiques sur des coupes ultrafines d'éléments de C'_{25} après enrobage dans le GMA. x 30 000. Double col. classique.

c) Témoin. On peut voir les masses rondes de chromatine ($\blacktriangleright$) et les éléments fibrillaires ($\longrightarrow$).

d) Après 5 heures de traitement par la RNAase. La coloration du matériel fibrillaire ($\longrightarrow$) a décru par rapport à c).

e) Après 1 heure de traitement par la pepsine et 5 heures de traitement par la RNAase. La coloration de toutes les structures est fortement réduite.

f,g : Digestions enzymatiques sur les coupes ultrafines d'éléments de C'_{25} après enrobage dans le GMA . x 60 000 . Coloration préférentielle pour les RNPs.

Dans le témoin (f), on reconnaît le réseau fibrillaire ($\longrightarrow$).

Après digestion par la RNAase, les fibrilles ont disparu, mais les granules restent bien visibles (g).

Fig. 5 : AUTORADIOGRAPHIE ULTRASTRUCTURALE

La coloration préférentielle pour les RNPs est appliquée.

a) Fraction C_{25} . Les cellules d'hépatome ascitique sont marquées par 3 minutes d'incorporation d'uridine (3H). La chromatine (chr) est décolorée et on observe une accumulation de grains d'argent au niveau de matériel RNP fortement coloré ($\longrightarrow$) . x 8 000.

b,c) Fraction C'_{25} (après traitement par NH_4Cl , Héparine) . Les cellules C.H.O. sont marquées par 15 minutes d'incorporation d'uridine (3H). Les grains d'argent se localisent essentiellement au niveau des groupes de RNPs fibrillaires ($\blacktriangleright$) et entre les structures chromatinienne sphériques. b) x 20 000 . c) x 30 000 .

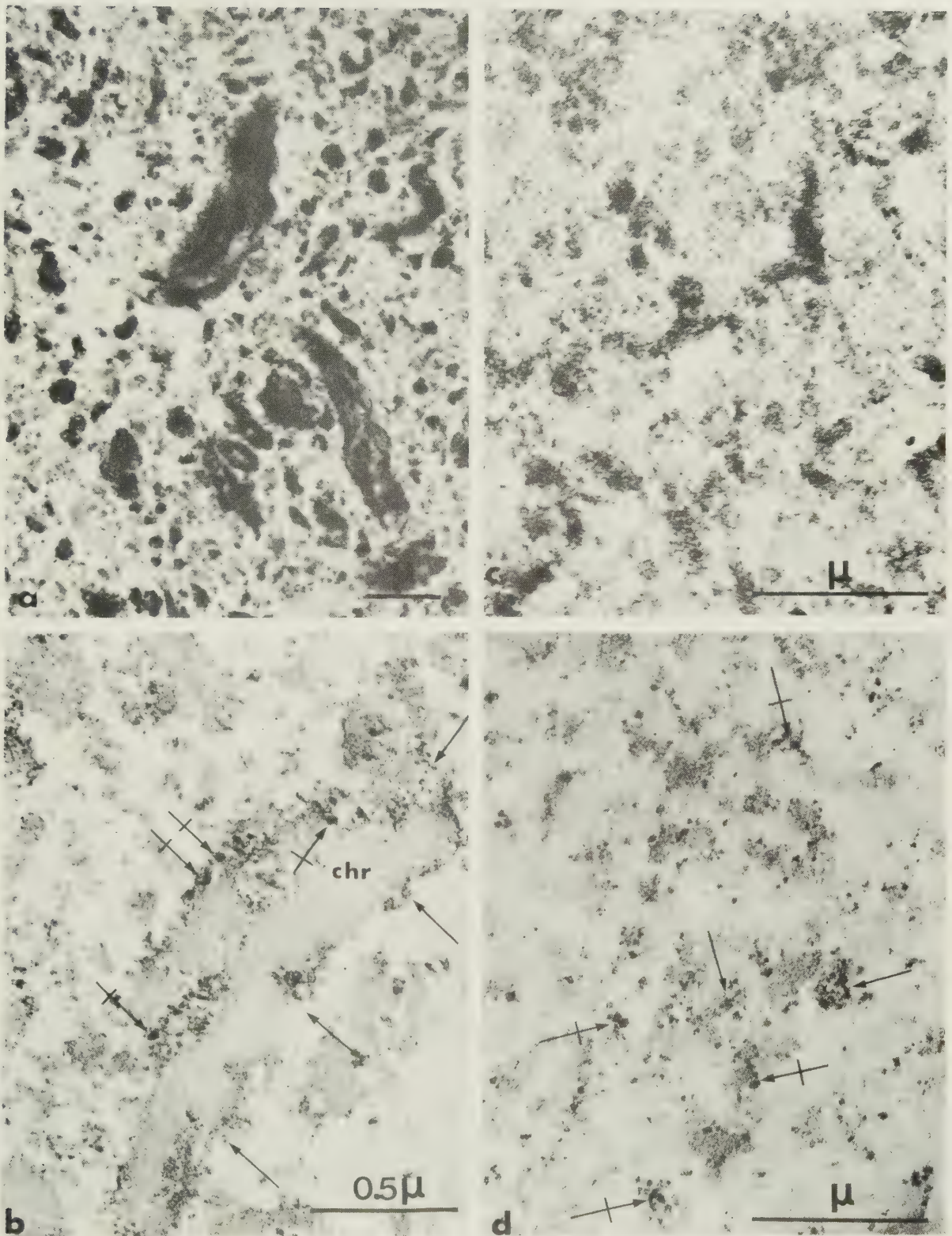


Fig . 3

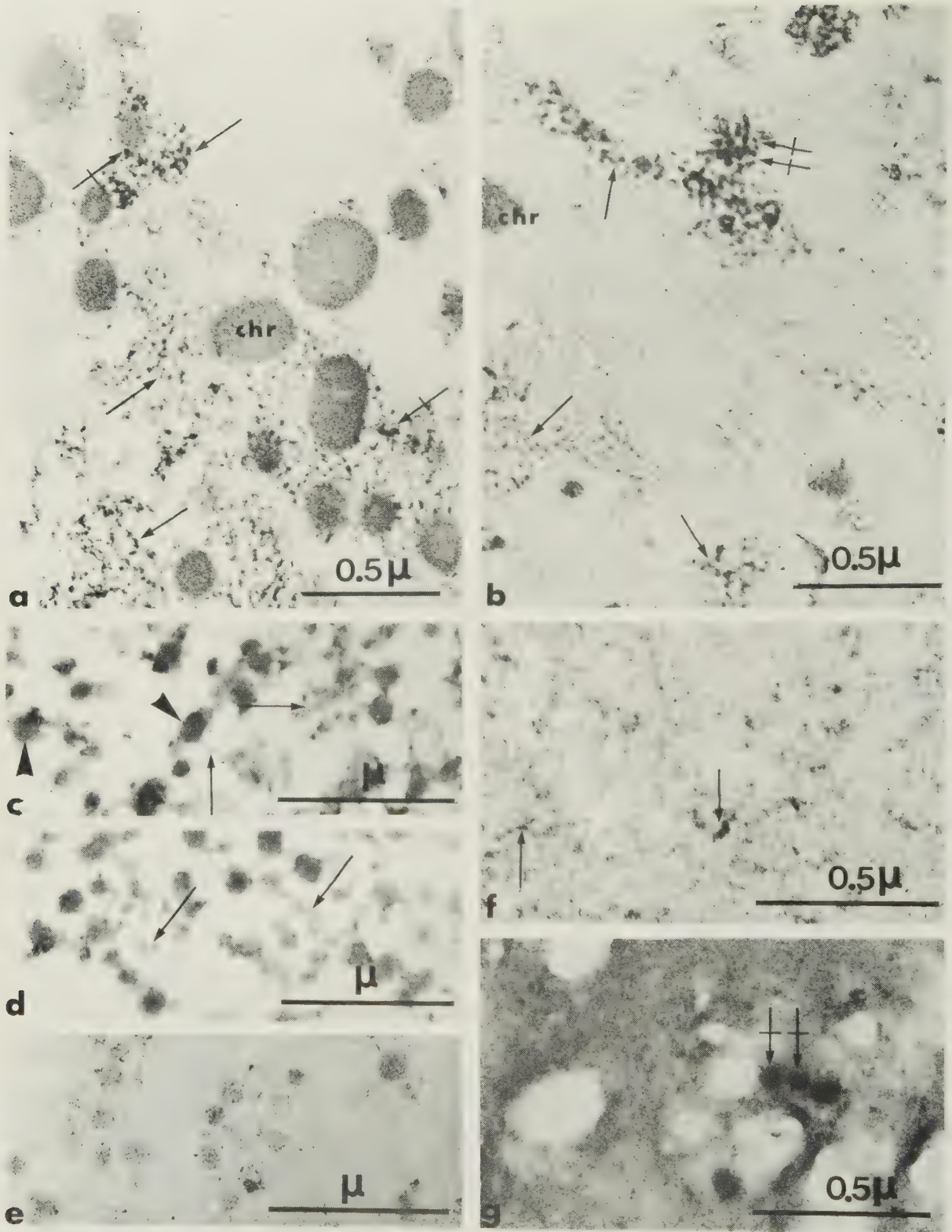


Fig .4

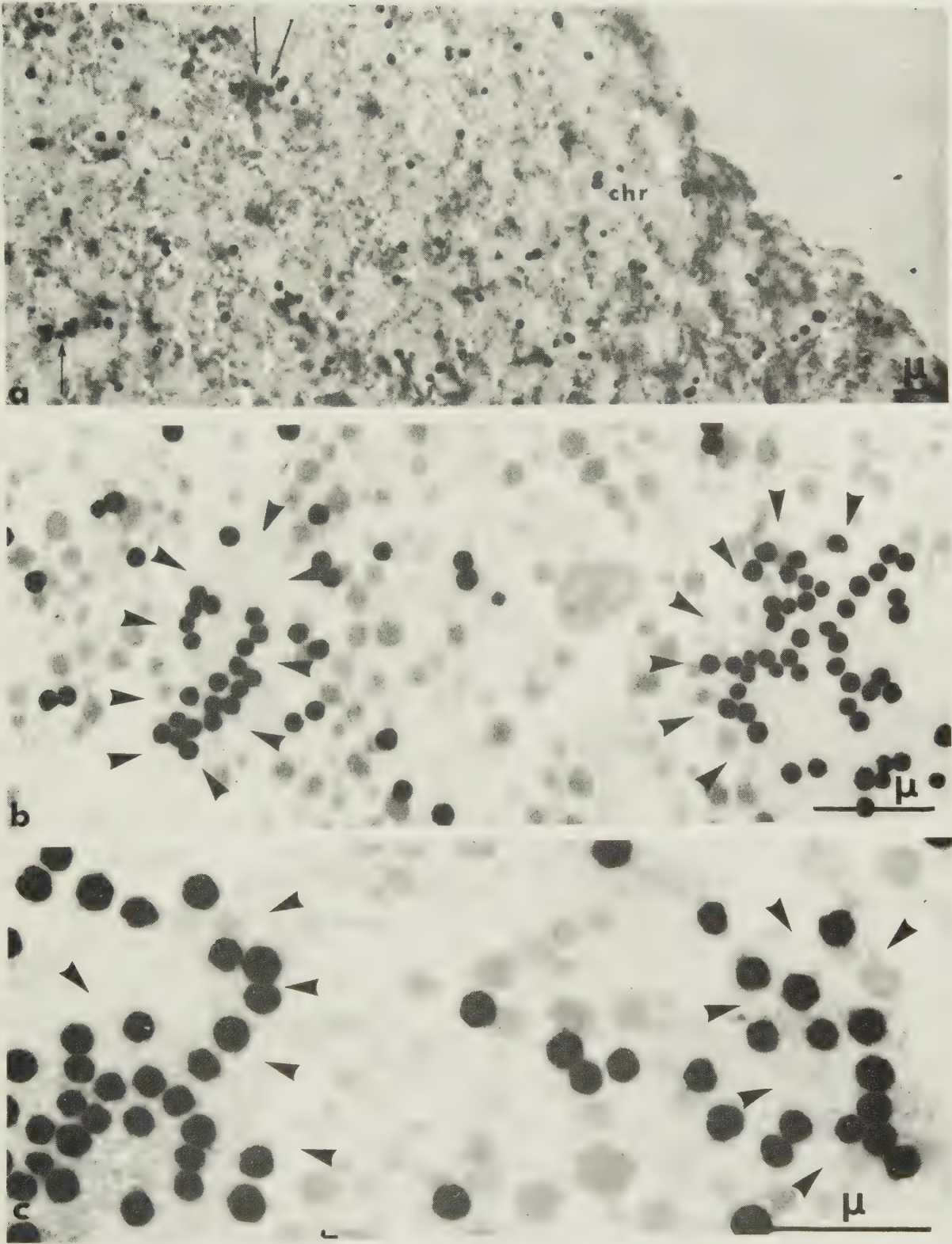


Fig. 5

réseau de fibrilles d'environ 60 Å de diamètre. Ces fibrilles apparaissent étroitement associées aux structures chromatinienues arrondies et sont parfois situées à leur périphérie. Dans le réseau fibrillaire, on peut identifier des granules d'environ 400 Å de diamètre. Ces granules sont parfois isolés, ou peuvent former des petits groupes.

Les fibrilles et les granules apparaissent nettement quand la coloration préférentielle pour les RNPs est appliquée. Dans ces conditions (fig. 4a), les structures chromatinienues plus ou moins sphériques ne sont que faiblement décolorées.

Si le traitement NH_4Cl , Héparine est effectué en présence de DNAase I (100 µg/ml), les éléments sphériques caractéristiques disparaissent à peu près complètement (fig. 4b) tandis que les RNPs fibrillaires et granulaires sont bien préservés.

L'étude morphologique a donné des résultats tout à fait analogues pour les deux types cellulaires qui ont été étudiés (hépatome ascitique du rat et cellules CHO).

L'effet du traitement NH_4Cl , Héparine sur les éléments de la fraction C_{100} a été également étudié. Les résultats qualitatifs sont très analogues pour C'_{100} et C'_{25} .

Contrôles cytochimiques ultrastructuraux.

Quand une digestion par la RNAase est effectuée sur la fraction C'_{25} après enrobage dans le GMA, l'effet est minime, même après 5 heures d'action (fig. 4d, témoin non traité RNAase fig. 4c).

Si le traitement par la RNAase est réalisé sur des coupes fines à congélation, l'effet est plus important : la coloration préférentielle pour les RNPs permet de constater la disparition complète des fibrilles, tandis que le contraste des granules reste inchangé (fig. 4f et g.).

La double digestion, pepsine + RNAase, n'a pu être faite sur les coupes fines à congélation du fait de la grande sensibilité à l'action protéolytique. Par contre, quand le traitement est effectué sur du matériel enrobé dans le GMA, le contraste de toutes les structures est nettement diminué (fig. 4e).

6. AUTORADIOGRAPHIE ULTRASTRUCTURALE .

Dans une première expérience (cellules d'hépatome ascitique du rat), après 3 minutes d'incorporation d'uridine (^3H) ($100 \mu\text{C/ml}$), les cellules sont fractionnées selon le schéma du tableau 1 et les fractions C_{25} et C_{100} sont traitées pour observation par autoradiographie, dans les conditions décrites plus haut. Après une exposition prolongée (9 mois), un marquage significatif a pu être détecté dans les deux fractions. Bien que la pouvoir de résolution ne permette pas d'affirmer que les grains d'argent se localisent exactement sur les particules RNPs, on peut observer une accumulation nette au niveau de structures RNPs très colorées, regroupées dans certaines zones (fig. 5a).

Dans une deuxième expérience (cellules CHO), le marquage est de 15 minutes, ce qui permet de réduire nettement la durée d'exposition des autoradiographies (2 mois). Les fractions C_{25} et C_{100} présentent un aspect très analogue à celui obtenu dans la première expérience (fig. 5a).

Dans cette expérience, les fractions C'_{25} et C'_{100} obtenues après le traitement NH_4Cl , Héparine ont été également étudiées. La dispersion partielle des structures permet alors d'observer de façon plus précise un marquage au niveau des groupes de fibrilles et granules.

Il est remarquable de constater que, entre les structures "chromatiniennes" sphériques et "amorphes" les grains d'argent se localisent préférentiellement sur les RNPs fibrillaires (fig. 5 b et c).

DISCUSSION

Les conditions expérimentales qui ont été utilisées pour disperser les constituants nucléaires -sonication à basse force ionique en présence de concentrations bien déterminées d'ion Mg^{++} - ont été définies de manière à préserver au maximum l'intégrité des complexes RNPs et DNPs. Elles permettent, par ailleurs, d'isoler des nucléoles purifiés dont l'organisation ultrastructurale est bien conservée (en particulier, préservation de la chromatine associée au nucléole).

Dans ces conditions, les parties non-nucléolaires du noyau sont dissociées en structures de dimensions variables, mais de taille généralement inférieure à celle des nucléoles. Divers types d'éléments subnucléaires plus ou moins dissociés, peuvent être recueillis par centrifugations différentielles. Les résultats obtenus, tant du point de vue biochimique que du point de vue ultrastructural, n'ont pas permis de déceler d'importantes différences dans le contenu des fractions C_{25} et C_{100} , si ce n'est en ce qui concerne la taille et le niveau moyen de déstructuration des arrangements complexes entre chromatine et éléments RNPs.

Fraction C_{25} :

La fraction C_{25} rassemble la majeure partie de l'ADN et de l'ARN nucléaires non nucléolaires.

L'ARN qui est retrouvé dans C_{25} possède des propriétés caractéristiques de l'ARN Hn classiquement décrit : distribution en taille hétérogène, masse molaire moyenne élevée (particulièrement pour les molécules nouvellement synthétisées) insensibilité de sa biosynthèse à de faibles doses d'actinomycine D (contrairement à l'ARN ribosomique).

L'étude ultrastructurale des éléments retrouvés dans C_{25} (ou même dans C_{100}) a montré la présence d'arrangements définis entre chromatine et RNPs qui ressemblent à des types d'organisation spatiale identifiables *in situ*.

Du point de vue des éléments RNPs, deux espèces ont été détectées, respectivement de type fibrillaire et granulaire.

RNPs fibrillaires :

D'après leurs caractéristiques cytochimiques et leur distribution topographique, ils sont similaires aux fibrilles périchromatiniens, précédemment observés *in situ* par MONNERON et BERNHARD (1969). Tout d'abord, ils apparaissent plus sensibles vis-à-vis de l'action de la RNAase que le constituant granulaire et ils disparaissent presque complètement après la double digestion pepsine + RNAase. De plus, le constituant fibrillaire est toujours détecté en association étroite avec la chromatine, se présentant soit sous forme d'une mince bordure à la périphérie de zones chromatinien-nes (fraction C_{25}) soit en liaison avec les masses sphériques amorphes de chromatine (dans la fraction C'_{25}).

Le diamètre moyen de ces éléments fibrillaires (50 à 100 Å) est du même ordre que celui qui avait été déterminé par les fibrilles périchromatiniens *in situ*.

Jusqu'ici, seules des indications indirectes suggéraient que les fibrilles périchromatiniens pouvaient représenter l'état morphologique de l'ARN Hn nouvellement synthétisé. Ainsi, par autoradiographie après marquage court par l'uridine (^3H), FAKAN et BERNHARD (1971) avaient observé que la radioactivité incorporée se localise préférentiellement *in situ* au niveau des zones où se situent normalement les fibrilles périchromatiniens, à la séparation entre des zones de chromatine condensée et de chromatine décolorée par le traitement par l'EDTA.

Par ailleurs, PETROV et BERNHARD (1971) avaient constaté qu'un traitement de rats à jeun par la cortisone provoquait, au bout d'une trentaine de minutes, l'apparition de fibrilles périchromatiniens dans les hépatocytes, parallèlement à une stimulation de la biosynthèse d'ARN. D'un autre côté, PETROV et SEKERIS (1971) ont observé que le blocage de la synthèse d'ARN extranucléolaire, obtenu sur des cellules de foie de rat par l'action de l' α -amanitine, était relié, du point de vue ultrastructural, à une diminution importante de la quantité de fibrilles périchromatiniens.

Alors qu'*in situ* il n'est pas possible, faute d'un pouvoir de résolution suffisant, de mettre en évidence un marquage spécifique des fibrilles périchromatiniens, nous avons pu montrer clairement le marquage préférentiel des régions fibrillaires (après un temps d'incorporation court) au niveau d'éléments non-nucléolaires isolés, après le traitement NH_4Cl , Héparine. Ce résultat établit de manière directe que le constituant fibrillaire isolé, qui présente des caractéristiques identiques à celles des fibrilles périchromatiniens *in situ*, représente l'état morphologique de l'ARN Hn nouvellement synthétisé.

RNPs granulaires :

On peut déceler, dans les fractions C_{25} et C_{100} , des granules de 400 à 500 Å de diamètre, qui se localisent à l'intérieur ou autour des masses de chromatine décolorées. De petits groupes de ces granules répartis entre les zones fibrillaires, sont visibles dans la fraction C'_{25} obtenue après traitement NH_4Cl , Héparine. Ces granules sont résistants à la digestion par la RNAase, même dans le cas des coupes à congélation. Leurs caractéristiques sont analogues à celles des granules périchromatiniens détectés *in situ*, non seulement à la périphérie de la chromatine condensée (MONNERON et BERNHARD -1969-) mais aussi à l'intérieur de cette chromatine après qu'elle ait été décolorée par traitement à l'EDTA.

Il a été suggéré que les granules périchromatiniens pouvaient jouer un rôle dans le transfert de l'information génétique du noyau au cytoplasme et qu'ils pouvaient correspondre aux "ARN-informofères" isolés et étudiés par le groupe de GEORGIEV (SAMARINA et al.-1968-).

Leurs caractéristiques ultrastructurales et cytochimiques sont similaires à celles des grains de Balbiani qui ont été identifiés au

niveau des chromosomes géants des diptères (VASQUEZ-NIN et BERNHARD -1971-) et qui peuvent traverser l'enveloppe nucléaire (STEVENS et SWIFT-1866-). Le nombre de ces granules s'accroît quand l'ARN nucléaire non-nucléolaire ne peut être normalement transféré dans le cytoplasme, comme c'est le cas pour des cellules de foie de rat après un traitement par l'aflatoxine, la lasiocarpine ou par de faibles doses d'actinomycine D (MONNERON et al. -1968-).

L'analyse biochimique de l'ARN des éléments non-nucléolaires isolés a permis d'observer, pour des durées d'incorporation relativement longues, la présence d'espèces moléculaires de taille discrète, de type ribosomique, superposés à l'ARN de taille hétérogène. Une première possibilité à envisager est que des fragments nucléolaires, et par conséquent des ARNs nucléolaires, se retrouvent dans les fractions dites "extra-nucléolaires". Cependant, les résultats de l'étude en microscopie électronique conduisent à écarter cette hypothèse, aucune structure de type nucléolaire ne pouvant être identifiée dans ces fractions. Par ailleurs, même dans l'hypothèse où des débris nucléolaires seraient présents et où le taux de contamination de la fraction C_{25} atteindrait la limite supérieure déterminée expérimentalement (voir tableau 2), l'ensemble du marquage détecté au niveau des ARNs de type ribosomique ne pourrait être simplement attribué à la présence de ces fragments nucléolaires.

On peut envisager par ailleurs que des fuites d'ARNs nucléolaires se produisent au cours du fractionnement et entraînent une contamination des éléments non-nucléolaires, sans que de véritables fragments nucléolaires soient décelables. Il est difficile de tester expérimentalement cette hypothèse. Cependant, nos résultats indiquent que si une fuite d'éléments nucléolaires se produit lors du fractionnement, elle intéresse surtout les formes d'ARNs nucléolaires les plus maturées : après un marquage relativement court, on ne peut détecter, sur le profil de l'ARN marqué extrait de C_{25} , l'espèce discrète préribosomique nucléolaire de 45S; de plus, ce profil n'est pas modifié, ni qualitativement, ni quantitativement, dans le cas d'un pré-traitement par de faibles doses d'actinomycine D.

Enfin, pour des durées de marquage intermédiaires (30 minutes), on n'observe pas de pic 28S nettement marqué pour l'ARN extrait de la fraction C_{25} tandis que cette espèce moléculaire est déjà marquée au niveau du nucléole (résultat non montré).

Il se peut donc que la détection d'ARNs de type ribosomique au niveau des fractions non-nucléolaires ait une réelle signification physiologique : elle pourrait correspondre au transfert vers le cytoplasme des éléments préribosomiques dont la maturation intranucléolaire est terminée.

La majeure partie des ARNs non-nucléolaires de type ribosomique se retrouve au niveau des éléments sédimentant à 25 000 g. Dans ces conditions expérimentales, des éléments préribosomiques libres, comme les préribosomes extraits du nucléole, ne sédimentent pas et seraient retrouvés presque uniquement dans les fractions C_{100} ou S_{100} . Il apparaît donc que ces ARNs de type ribosomique sont intégrés dans des éléments relativement

complexes, dont ils peuvent être préférentiellement enlevés après un traitement Héparine, NH_4Cl (voir fig. 2). Si l'association de ces ARNs avec les éléments qui contiennent l'ARN Hn nouvellement synthétisé ne résulte pas d'un simple effet artificiel intervenant lors du fractionnement, il faudrait rapprocher ces résultats de l'hypothèse d'HARRIS (1974) attribuant au nucléole un rôle important dans le contrôle de la maturation des précurseurs de l'ARN messager et du transport de ces molécules vers le cytoplasme, grâce à la fixation des préribosomes venant du nucléole sur les chaînes d'ARN Hn naissant.

Le fractionnement préliminaire qui a été réalisé à partir des arrangements complexes entre chromatine et RNPs (retrouvés dans la fraction C_{25}) permet d'envisager le développement d'une étude fine portant d'une part sur les structures RNPs (isolées après traitement de la fraction C'_{25} par la DNAase) et, d'autre part, sur les zones chromatiniennes retrouvées dans C'_{25} qui restent préférentiellement associées aux RNPs contenant l'ARN Hn nouvellement synthétisé.

CONCLUSIONS

GENERALES

L'étude ultrastructurale du noyau in situ montre qu'il existe, à la fois dans le nucléole et dans les régions non-nucléolaires, des types d'organisation caractéristiques entre des zones chromatinienne particulières et diverses formes d'éléments RNPs. C'est pour tenter de préciser, au niveau moléculaire, les relations structurales et fonctionnelles entre la chromatine active et les éléments qui contiennent l'ARN nouvellement synthétisé que nous avons entrepris d'isoler ces types de structures complexes et de définir divers moyens permettant d'aborder leur étude fine.

Nous avons choisi le nucléole comme modèle d'étude d'un système chromatinien activement transcrit et intégré, du point de vue structural et fonctionnel, au niveau duquel peut être suivie une séquence de réactions de synthèse et de maturation d'un ARN défini. Plus particulièrement, nous avons tenté d'associer à la description formelle des processus fonctionnels la détermination de l'organisation ultrastructurale et topographique des constituants macromoléculaires concernés.

A partir d'une technique d'isolement des nucléoles qui préserve les caractéristiques biochimiques et ultrastructurales essentielles de cet organelle, nous avons entrepris l'étude des produits de la transcription des gènes nucléolaires.

Nous avons pu définir une méthode originale d'extraction, dans laquelle la dissociation partielle des structures nucléolaires isolées est obtenue par action d'un polyanion, l'héparine. Cette méthode conduit à une libération exhaustive des ARNs nucléolaires sous forme de complexes RNPs.

L'analyse biochimique des constituants moléculaires -ADN et protéines- des RNPs nucléolaires isolées et l'étude de leur métabolisation ont permis de préciser leur place dans la séquence des réactions de la maturation ribosomique.

Parmi les divers types de RNPs que nous avons identifiés, la plupart ont des caractéristiques analogues à celles d'éléments préribosomiques isolés par d'autres auteurs, suivant des procédés différents. Cependant, l'étude des phases post-transcriptionnelles précoces a mis en évidence l'existence d'une espèce RNP, non encore décrite, dont la durée de vie est courte et dans laquelle est intégré l'ARN nucléolaire nouvellement synthétisé. Cette classe de RNP nucléolaire a les propriétés de précurseur des autres éléments préribosomiques déjà connus.

La caractérisation biochimique des préribosomes nucléolaires a été complétée par une étude ultrastructurale, par microscopie électronique, qui a montré la présence de particules de dimensions voisines de celles des RNPs granulaires observées dans le nucléole in situ. Des associations entre particules isolées peuvent être observées dans certaines conditions (présence d'ion Mg^{++}); les données biochimiques suggèrent que ces associations peuvent correspondre à la conservation partielle d'arrangements supra-particulaires existant in situ.

L'étude des processus intranucléolaires de la maturation ribosomique a été abordée en relation avec celle des protéines nucléolaires dont l'origine et le devenir dans le nucléole ont été précisés d'une manière préliminaire. Des études cinétiques du marquage des protéines ont montré que la majeure partie des protéines du nucléole sont synthétisées hors du nucléole puis rapidement transférées dans cet organelle. Ce transfert est dépendant de la biosynthèse de l'ARN préribosomique; il n'intéresse pas également les diverses classes de protéines nucléolaires.

Parallèlement à l'étude des étapes fonctionnelles de la maturation préribosomique, nous avons défini plusieurs moyens expérimentaux pouvant permettre d'envisager une étude fine de l'ensemble de l'appareil chromatinien nucléolaire.

En premier lieu, nous avons caractérisé un système d'incubation *in vitro* de nucléoles isolés, en vue de relier précisément la complétion de réactions fonctionnelles bien déterminées à des modifications éventuelles de l'organisation ultrastructurale du nucléole et d'examiner le rôle régulateur de facteurs extra-nucléolaires. Différentes étapes fonctionnelles, intervenant soit au cours de la transcription, de la maturation ou de l'exportation de l'ARN nucléolaire, peuvent avoir lieu *in vitro*, au niveau des nucléoles isolés.

D'autre part, nous avons mis au point différentes méthodes qui permettent d'isoler et d'étudier des éléments subnucléolaires définis, se caractérisant par leur rôle fonctionnel, leur organisation ultrastructurale ou leur localisation topographique dans l'appareil nucléolaire. En particulier, nous avons pu définir, par une étude corrélative biochimique et ultrastructurale, un système de dissection physicochimique du nucléole isolé dans lequel le niveau de déstructuration du nucléole peut être modulé par la concentration en ion Mg^{++} . Nous pouvons isoler, dans ces conditions, des sous-structures nucléolaires élémentaires dont l'organisation ultrastructurale ressemble étroitement à celle des zones au niveau desquelles se localise *in situ* l'ARN nouvellement synthétisé.

La mise en évidence et l'isolement de l'appareil nucléolaire d'éléments structurés pouvant correspondre à des sous-ensembles d'organisation structurale et fonctionnelle, nous a amenés à étendre notre étude à la chromatine non-nucléolaire, en vue d'examiner s'il est possible d'y reconnaître des unités organisées correspondant à l'association de chromatine avec ses produits de transcription.

Nous avons isolé des régions non-nucléolaires du noyau des structures complexes où des zones chromatinienne et des types RNPs morphologiquement définis conservent une organisation mutuelle très analogue à celle qui peut être observée in situ. En particulier, restent partiellement préservées des associations entre chromatine et RNPs périchromatiniens, de type fibrillaire et granulaire.

L'étude en autoradiographie ultrastructurale a montré que l'ARN Hn nouvellement synthétisé se localise essentiellement au niveau des RNPs de type fibrillaire.

Une dissociation partielle de ces arrangements a pu être obtenue par enlèvement de la majeure partie de la chromatine; elle conduit à l'isolement d'un réseau où restent intégrés des éléments RNPs.

Actuellement, nous sommes donc en mesure d'isoler, des régions nucléolaires et non-nucléolaires, des éléments à structure complexe dans lesquels des régions chromatinienne sont étroitement associées à diverses formes de RNPs -en particulier, à ceux qui contiennent l'ARN nouvellement synthétisé- et dont l'organisation caractéristique est relativement bien préservée.

BIBLIOGRAPHIE

- ADESNIK M., DARNELL J. 1972, J. Mol. Biol. 67, 397-406.
Biogenesis and characterization of histone messenger RNA in HeLa cells.
- AL-ARIF A., SPORN M.B., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1716-1719.
2'-O-methylation of adenosine, guanosine, uridine and cytidine in RNA of isolated rat liver nuclei.
- AMALDI F., 1969, Nature, 221, 95-96
Non-random variability in evolution of base compositions of ribosomal RNA
- AMALRIC F. 1973,
Thèse de Doctorat ès-Sciences (Université P. Sabatier, Toulouse).
- AMALRIC F., ZALTA J.P., SIMARD R., 1969, Exp. Cell. Res. 55, 370-376.
Effet de la température supra-optimale sur les RNPs et l'ARN nucléolaire. II. Etude biochimique.
- ANDERSON N.G., WILBUR K.M., 1951, J. Gen. Physiol. 34, 647-656
Studies on isolated cell components; release of nuclear gel by heparin.
- AUGER M.A. et TIOLLAIS P. (1973) Biochimie, 55; 163-169.
Localization in nucleolar RNP of the 3 molecular species constituting the "45S fraction" ribosomal RNA.
- AUGER M.A. et TIOLLAIS P., 1974, Eur. J. Biochem. 48, 157-165.
5S RNA : Biosynthesis and association to immature ribosomal particles in the nucleus of lymphocytic mouse leukemia cells, L 5178 Y.
- BACHELLERIE J.P., MARTIN-PREVEL C. ZALTA J.P., 1971, Biochimie. 53.383-389
Cinétique de l'incorporation d'uridine (³H) dans des fractions sub-nucléolaires de cellules d'hépatome ascitique du rat.
- BACHELLERIE J.P., MARTIN-PREVEL C. ZALTA J.P., 1972, Exp. Cell. Res. 71, 177-187.
Cinétique de marquage des protéines nucléolaires. Mise en évidence d'une fraction rapidement marquée.
- BACHELLERIE J.P. NICOLOSO M., ZALTA J.P. 1975 (a) Eur. J. Biochem. sous presse
Early nucleolar preribosomal RNP in mammalian cells.
- BACHELLERIE J.P., AMALRIC F., NICOLOSO M., ZALTA J.P., SIMARD R., 1975, (b) actuellement soumis pour publication.
In vitro stepwise dissociation of nucleoli isolated from mammalian cells. I. Biochemical study.
- BACHELLERIE J.P., PUVION E., ZALTA J.P., 1975, (c) Eur. J. Biochem. sous presse
Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-RNP complexes isolated from mammalian cell nuclei.
- BALTIMORE D., HUANG A.S., 1968, Science 162, 572-574
Isopycnic separation of subcellular compound from polio-virus infected and normal HeLa cells.

- BALTIMORE D., HUANG A.S. , 1970, J. Mol . Biol. 47, 263-273.
Interaction of Hela cell proteins with RNA.
- BARRY J.M., MERRIAM R.W., 1972, Exp. Cell Res. 71, 90-96.
Swelling of hen erythrocyte nuclei in cytoplasm from *Xenopus* eggs.
- BENEDETTI E.L., BONT W.S., BLOEMENDAL M., 1966, Lab. Invest. 15, 196-208
Electron microscopic observation on polyribosomes and endoplasmic reticulum fragments isolated from rat liver.
- BENICHOU J.C., RYTER A. , 1973, J. Microsc.(Paris) 17,227-232.
Mise au point de la technique de coupes à congélation pour les bactéries gram+ et gram-.
- BERNHARD W., GRANBOULAN N., 1963, Exp. Cell Res. suppl.9, 19-53.
The fine structure of the cancer cell nucleus.
- BERNHARD W., 1966, National Cancer Institute Monograph 23, p. 13-38.
Ultrastructural aspects of the Normal and Pathological Nucleolus in Mammalian Cells.
- BERNHARD W. 1969, J. Ultrastr. Res. 27, 250-265
A new staining procedure for electron microscopical cytology.
- BERNHARD W., VIRON A. , 1971, J. Cell Biol. 49, 731-746.
Improved techniques for the preparation of ultrathin frozen sections.
- BHORJEE J.S., PEDERSON T., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,69,3345-3349
Non-histone chromosomal proteins in synchronized Hela cells.
- BIRNSTIEL M., WALLACE H., SIRLIN J.L., FISCHBERG M., 1966, National Cancer Institute Monograph 23, 431-448.
Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer region of *Xenopus laevis*.
- BIRNSTIEL M., SPEIRS J., PURDOM I., JONES K., 1968, Nature,219,454-463.
Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite of *Xenopus laevis*.
- BRAM S., RIS H., 1971, J. Mol. Biol. 55, 325-336.
Structure of nucleohistone.
- BRASH K., SELIGY V.L. et SETTERFIELD G., 1971, Exp. Cell. Res. 65, 61.
Effets of low salt concentration on structural organization and template activity of chromatin in chicken erythrocyte nuclei.
- BROWN D.D., WEBER C.S., 1968, J. Mol. Biol. 34, 681-697.
Gene linkage by RNA-DNA hybridization.
II. Arrangement of the redundant gene sequences for 28 and 18S ribosomal RNA.

- BROWN D.D., WENSINK P.C. JORDAN E., 1972. J. Mol. Biol. 63,57-73
A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri* : the evolution of tandem genes.
- BRUSKOV W.I. et KISELEV N.A. , 1968. J. Mol. Biol. 37, 367-377
Electron microscope study of the structure of E.Coli ribosomes and CM-like particles.
- BUCKINGHAM M.E., CAPUT D., COHEN A., WHALEN R.G., GROS F., 1974.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1466-1470.
The synthesis and stability of Cytoplasmic Messenger RNA During Myoblast Differentiation in Culture.
- BURTON K., 1956, Biochem. J. 62, 315-323.
The conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
- BUSCH H., DESJARDINS R., GROGAN D. HIGASHI K., JACOB S.T., MURAMATSU M., RO T.S., STEELE W.J., 1966, Nat. Cancer Inst. Monograph 23, 193-212.
Composition of nucleoli isolated from mammalian cells.
- BUSCH H., SMETANA K., 1970, The Nucleolus - Academic Press - New York-London.
- CHAMBON P., GISSINGER F., KEDINGER C., MANDEL J.L., MEILHAC M., 1974,
The cell nucleus vol. III, p. 269-308 (H. Busch, ed.) Acad. Press.
Animal nuclear DNA-dependent RNA polymerases.
- CHOI Y.C., BUSCH H., 1970, J. Biol. Chem. 245, 1954-1961.
Structural analysis of nucleolar precursors of ribosomal RNA :
Studies on the 5'-terminal and alkali resistant dinucleotides of nucleolar high molecular weight RNA.
- COX R.A., 1969, Biochem. J. 114, 753-767
The effect of pancreatic RNAase on rabbit reticulocyte ribosomes and its interpretation in terms of ribosome structure.
- CRAIG N.C., PERRY R.P., 1970, J. Cell Biol. 45, 554-564.
Aberrant intranucleolar maturation of ribosomal precursors in the absence of protein synthesis.
- CRAIG N.C., PERRY R.P., 1971, Nat. New Biology 229, 75-80
Persistent cytoplasmic synthesis of ribosomal proteins during the selective inhibition of ribosomal RNA synthesis.
- DARNELL J.E., PHILIPSON L., WALL R., ADESNIK M., 1971, Science, 174, 507-510
Polyadenylic acid sequences:role in conversion of nuclear RNA into mRNA.
- DARNELL J.E., WALL R., TUSHINSKY R.J., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 1321-1325.
An adenylic acid-rich sequence in messenger RNA of HeLa cells and its possible relationship to reiterated sites in DNA.

DASS C.M.S., BAYLEY S.T., 1965, J. Cell Biol. 25, 9-22.

A structural study of rat liver ribosomes.

DAWID I.B., BROWN D.D., REEDER R.H., 1970, J. Mol. Biol. 51, 341-360.
Composition and structure of chromosomal and amplified ribosomal DNAs, of *Xenopus laevis*.

DESSEV G.N., GRANCHAROV K., 1973, J. Mol. Biol. 76, 425-444.
Degradation of RNA in rat liver ribosomes.

EDMONDS M.P., VAUGHAN M.H., NAKAZATO H., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1336-1340.
Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA of HeLa cells : possible evidence for a precursor relationship.

FAKAN S., BERNHARD W., 1971, Exp. Cell Res. 67, 129-141.
Localization of rapidly and slowly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography.

FISCHER G.A., 1958, Ann. N.Y. Acad. Sci. 76, 673-680.
Studies of the culture of leukemic cells in vitro.

FRENSTER J.H., ALLFREY V.G., MIRSKY A., 1963, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50, 1025.
Repressed and active chromatin isolated from interphase lymphocytes. IO32

GEORGIEV G.P., SAMARINA O.P., LERMAN M.L., SMIRNOV M.N., SEVERTZOV A.N., 1963.
Nature, 200, 1291-1294.

Biosynthesis of messenger and ribosomal RNAs in the nucleolochromosomal apparatus of animal cells.

GILES K.W., MYERS A., 1965, Nature, 206, 93.
An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid.

GILLESPIE D., SPIEGELMAN S., 1965, J. Mol. Biol. 12, 829-842.

A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane.

GIUDICE G., PIRRONE A.M., ROCCHERI M., TRAPANI M., 1973, Biochim. Biophys. Acta 319, 72-80.
Maturational cleavage of nucleolar ribosomal RNA precursor can be catalyzed by non-specific endonuclease.

GORNALL A.C., BARDAWILL C.S., DAVID M.M., 1948
J. Biol. Chem. 177, 751-766

Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.

GRANBOULAN N, GRANBOULAN P., 1964, Exp. Cell Res. 34, 71-87.
Cytochimie Ultrastructurale du Nucléole I. Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du nucléole.

- GRANBOULAN N., GRANBOULAN P., 1965, Exp. Cell. Res. 38, 604-619.
Cytochimie ultrastructurale du Nucléole
II. Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et le noyau.
- GRANBOULAN N., BERNHARD W., 1961, C.R. Soc. Biol. 155; 1767-1779.
Ultrastructural cytochemistry: exploration of nuclear structures by enzymic digestion.
- GREENBERG H., PENMAN S., 1966, J. Mol. Biol. 21, 527-535.
Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells.
- GREENBERG J.R., PERRY R.P., 1972, J. Mol. Biol. 72, 91-98.
Relative occurrence of polyadenylic acid sequences in messenger and Hn RNA of L cells as determined by poly(U)-hydroxylapatite chromatog.
- GRUMMT I., LINDIGKEIT R., 1973, Eur. J. Biochem. 36, 244-249.
Preribosomal RNA synthesis in isolated rat-liver nucleoli.
- GRUMMT I., 1974, F.E.B.S. Lett. 39, 125-128.
Studies on the phosphorylation of nucleolar proteins. Identification of a nucleolus associated protein-kinase activity.
- HAASE G., JUNG G., 1964, Naturwiss, 51, 404-405
Preparation of monolayers of photographic emulsions.
- HADJIOLOV A.A., MILCHEV G.I., 1974, Biochem. J., 142, 263-272.
Synthesis and maturation of ribosomal RNA in isolated HeLa cell nuclei : A tracer study on the topology of the 45S precursor of ribosomal RNA.
- HANCOCK R., 1970, J. Mol. Biol. 48, 357-360.
Separation by equilibrium centrifugation in CsCl gradients of density-labelled and normal deoxyribonucleoprotein from chromatin.
- HARRIS H., 1974, Nucleus and Cytoplasm (voir p. 138)
Clarendon Press (Oxford).
- HEADY J.E., Mc CONKEY E.H., 1970, Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 30-36.
Completion of nascent HeLa ribosomal proteins in a cell-free system.
- HEARST J.E., BOTCHAN M., 1970, Ann. Rev. Biochem. 39, 151-182.
The Eukaryotic Chromosome.
- HUXLEY H.E., ZUBAY G., 1960, J. Mol. Biol. 2, 10-18.
Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from E.Coli.
- IMAIZUMI T., DIGGELMANN H., SCHERRER K. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1122-1126.
Demonstration of globin messenger sequences in giant nuclear precursors of messenger RNA of avian erythroblasts.

- IZAWA M., KAWASHIMA K., 1968, *Biochim. Biophys. Acta*, 155, 51-62.
RNA synthesis in the nucleoli of mouse ascites tumor cells in relation to nucleolar components.
- JACOB S.T., SAJDEL E.M., MUNRO H.N., 1969, *Eur. J. Biochem.* 7, 449-453.
Regulation of nucleolar RNA metabolism by hydrocortisone.
- KANG Y.J., OLSON M.O.J., BUSCH H., 1974, *J. Biol. Chem.* 249, 5580-5585
Phosphorylation of acid-soluble proteins in isolated nucleoli of Novikoff hepatoma ascites cells. Effects of divalent cations.
- KAWASHIWA K., IZAWA M., SATO S., 1971, *Biochim. Biophys. Acta*, 232, 192-206
Studies on the origin of proteins in the nucleoli of mouse ascites tumour cells : a test for protein transfer to the nucleoli.
- KEDINGER C., GNIAZDOWSKI M., MANDEL J.L., GISSINGER F., CHAMBON P.
1970. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 165-171.
 α -amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus.
- KEDINGER C., SIMARD R., 1974, *J. Cell Biol.* 63, 831-842.
The action of α -amanitine on RNA synthesis in Chinese Hamster Ovary cells. Ultrastructural and biochemical studies.
- KELLEY D.E., PERRY R.P., 1971, *Biochim. Biophys. Acta* 238, 357-362
The production of ribosomal RNA from high molecular weight precursors. II. Demonstration of an exonuclease in isolated nucleoli.
- KIRBY K.S., 1964, *Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 3, 1-31
Isolation and fractionation of nucleic acids .
- KOURILSKY P., MANTEUIL S., ZAMANSKY M.H., GROS F., 1970, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1080-1087.
DNA-RNA hybridization at low temperature in the presence of urea.
- KUMAR A., WARNER J.R., 1972, *J. Mol. Biol.* 63, 233-246.
Characterization of ribosomal precursor particles from HeLa cell nucleoli.
- KUMAR A., WU R.S., 1973, *J. Mol. Biol.* 80, 265-276.
Role of ribosomal RNA transcription in ribosome processing in HeLa cells.
- LAMKIN A.F., SMITH D.W., HURLBERT R.B., 1973, *Biochemistry* 12, 4137-4146
Independent protein synthesis in isolated rat tumor nucleoli
Aminoacylation of endogenous tRNA
- LAVAL M., BOUTEILLE M., 1973, *Exp. Cell Res.* 79, 391-403
Synthetic activity of isolated rat-liver nuclei.
II. Evidence for protein elaboration.

- LAVAL M., BOUTEILLE M., 1973, Exp. Cell. Res. 76, 337-348.
Synthetic activity of isolated rat liver nuclei.
I. Ultrastructural study at various steps of isolation.
- LEAKE R.E., TRENCH M.E., BARRY J.M., 1972, Exp. Cell. Res. 71, 17-26.
Effects of cations on the condensation of hen erythrocyte nuclei
and its relation to gene activation.
- LEDUC E.H., BERNHARD W., 1967, J. Ultrastruct. Res. 19, 196-199.
Recent modifications of the glycolmethacrylate embedding procedure.
- LEE S.Y., MENDECKI J., BRAWERMAN G., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 1331-1335.
A polynucleotide segment rich in adenylic acid in the rapidly
labeled polyribosomal RNA component of mouse sarcoma 180 ascites
cells.
- LEIBOWITZ R., WEINBERG R.A., PENMAN S., 1973, J. Mol. Biol. 73, 139-144.
Unusual metabolism of 5S RNA in HeLa cells.
- LIAU M.C., CRAIG N.C., PERRY R.P., 1968, Biochim. Biophys. Acta, 169, 196-205
The production of ribosomal RNA from high molecular weight
precursors. I. Factors which influence the ability of isolated
nucleoli to process 45S RNA.
- LIAU M.C., PERRY R.P., 1969, J. Cell Biol. 42, 272-283.
Ribosome precursor particles in nucleoli.
- LINDBERG U., DARNELL J.E., 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65, 1089-1096
SV 40-specific RNA in the nucleus and polyribosomes of transfor-
med cells.
- LINDIGKEIT R., BELLMANN K., FENSKE H., BÖTTGER M., HOLTZHAUER M., EICHHORN
I., 1974, FEBS Letters 44, 146-152.
Effect of removal of F1-histone on the conformation of nuclear
chromatin and on the transcription process.
- LITTAU V.C., BURDICK C.J., ALLFREY G.E., MIRSKY A.E., 1965, Proc. Natl
Acad. Sci. USA, 54, 1204-1212.
Role of histones in the maintenance of chromatin structure.
- LOENING U.E., 1967, Biochem. J. 102, 251-257,
The fractionation of high molecular-weight ribonucleic acid by
polyacrylamide-gel electrophoresis.
- LOENING U.E., 1968, J. Mol. Biol. 38, 355-365.
Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution.
- LOENING U.E., 1969, Biochem. J. 113, 131-138
The determination of the molecular weight of RNA by polyacrylamide
gel electrophoresis.

- LOWRY O.H., ROSEBROUGH A.L., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951, J. Biol. Chem. 193, 265-275.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
- Mc CONKEY E.H., 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1379-1383
Composition of mammalian ribosomal subunits : a reevaluation.
- MADEN B.E.H., VAUGHAN M.H., 1968, J. Mol. Biol. 38, 431-435.
Synthesis of ribosomal proteins in the absence of ribosome maturation in methionine-deficient HeLa cells.
- MADEN B.E.H., SALIM M., 1974, J. Mol. Biol. 88, 133-164.
The methylated nucleotide sequences in HeLa cell ribosomal RNA and its precursors.
- MAGGIO R., 1966, Nat. Cancer Institute Monograph 23, 213-222.
Progress report on the characterization of nucleoli from guinea pig liver.
- MAISEL J.C., Mc CONKEY E.H., 1970, J. Cell Biol. 47, 127a
Ribosomal proteins in the HeLa cell nucleolus.
- MARINOZZI V., BERNHARD W., 1963, Exp. Cell Res. 32, 595-598
Présence dans le nucléole de 2 types de RNPs morphologiquement distinctes.
- MARINOZZI V., 1964, J. Ultrastruct. Res. 10, 433-456.
Cytochimie Ultrastructurale du nucléole-RNA et Protéines intra-nucléolaires.
- MARMUR J., J. Mol. Biol. 3, 208-218.
A procedure for the isolation of DNA from microorganisms.
- MATHIAS A.P., WILLIAMSON R., HUXLEY E., PAGE S., 1964, J. Mol. Biol. 9, 154-167.
Occurrence and function of polysomes in rabbit reticulocytes
- MEJBAUM W., 1939, Z. Physiol. Chem. 258, 117-120
Estimation of small amounts of pentose especially in derivatives of adenylic acid.
- MILLER O.L. Jr., BAKKEN A.H., 1972,
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology
Acta Endocrinol. Suppl. 168, 155-177.
Morphological Studies of transcription.
- MIRAULT M.E., SCHERRER K., 1971, Eur. J. Biochem. 23, 372-386.
Isolation of preribosomes from HeLa cells and Their characterization by electrophoresis on uniform and exponential-gradient-polyacrylamide gels.

MIRAULT M.E., SCHERRER K., 1972, FEBS Lett. 20, 233-238.

In vitro processing of HeLa cell preribosomes by a nucleolar endoribonuclease.

MIRSKY A.E., BURDICK C.J., DAVIDSON E.H., LITTAU V.C., 1968, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 592-597.

The role of lysine-rich histone in the maintenance of chromatin structure in metaphase chromosomes.

MONNERON A., LAFARGE C., FRAYSSINET C., 1968, C.R. Acad.Sci.(sér.D) 267, 2053-2056

Induction by aflatoxin and by lasiocarpine of the accumulation of perichromatin granules in rat liver.

MONNERON A., MOULE Y., 1968, Exp. Cell Res. 51, 531.

Etude ultrastructurale de particules RNPs nucléaires isolées à partir du foie de rat.

MONNERON A., BERNHARD W., 1969, J. Ultrastruct. Res. 27, 266-288.

Fine structural Organization of the interphase nucleus in some mammalian cells.

MONTGOMERY T.H., 1898, J. Morphol. 15, 265-570.

Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus.

NAKAMURA T., RAPP F., BUSCH H., 1967, Cancer Res. 27, 1084-1091

Common features of the base composition of rapidly labeled RNA of nucleoli in a number of experimental tumors.

NARAYAN S., BIRNSTIEL M., 1969, Biochim. Biophys. Acta 190, 470-485.

Biochemical and structural characteristics of ribonucleoproteins isolated from rat liver cell nucleoli.

O'MALLEY B.W., MEANS A.R., 1974,

The Cell nucleus (H.Busch ed.) vol. III, p. 379-416, Acad. Press N.Y. - Effects of female steroid hormones on target cell nuclei.

ORRICK L.R., OLSON M.O., BUSCH H., 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70 1316-1320

Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

PEACOCK A.C., DINGMAN C.W., 1968, Biochemistry, 7, 668-674.

Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels.

PEDERSON T., KUMAR A.J., 1971, J. Mol. Biol. 61, 655-

Relationship between protein synthesis and ribosomal assembly in HeLa cells.

- PEDERSON T., 1974, J. Mol. Biol. 83, 163-183.
Proteins associated with heterogeneous nuclear RNA in eucaryotic cells.
- PERRY R.P., 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 2179-2186.
The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA.
- PERRY R.P., 1963, Natl. Cancer Inst. monograph 14, 73-89.
Role of the nucleolus in ribonucleic acid metabolism and other cellular processes.
- PERRY R.P., 1965, Nat. Cancer Inst. Monograph, 18, 325-340.
Nucleolus and the synthesis of ribosomes
- PERRY R.P., 1967, Progress in nucleic acid research and molecular Biology 6, 219-257.
The nucleolus and the synthesis of ribosomes.
- PERRY R.P., KELLEY D.E., 1968, J. Cell. Physiol. 72, 235-246.
Persistent synthesis of 5S RNA when production of 28S and 18S ribosomal RNA is inhibited by low doses of actinomycin D.
- PERRY R.P., CHENG T.Y., FREED J.J., GREENBERG J.R., KELLEY D.E.
TARTOF K.D., 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65, 609-616.
Evolution of the transcription unit of ribosomal RNA.
- PERRY R.P., KELLEY D.E., 1970, J. Cell Physiol. 76, 127-140.
Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D : characteristic dose-response of different RNA species.
- PERRY R.P., KELLEY D.E., 1972, J. Mol. Biol. 70, 265-279.
The production of ribosomal RNA from high molecular weight precursors. III. Hydrolysis of pre-ribosomal and ribosomal RNA by a 3'-OH specific *exo*-ribonuclease.
- PERRY R.P., LATORRE J., KELLEY D.E., GREENBERG J.R., 1972, Biochim. Biophys. Acta 262, 220-226.
On the lability of poly(A) sequences during extraction of mRNA from polysomes.
- PERRY R.P., KELLEY D.E., LATORRE J. (1974) J. Mol. Biol. 82, 315-331.
Synthesis and turnover of nuclear and cytoplasmic poly(A) in mouse L cells.
- PENE J.J., KNIGHT E., DARNELL J.E., 1968, J. Mol. Biol. 33, 609-623.
Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes.
- PENMAN S., SMITH I., HOLTZMAN E., 1966, Science, 154, 786-789.
Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cell nucleus.

- PETROV P., BERNHARD W., 1971, J. Ultrastr.Res.35, 386-402.
Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of the interphase nucleus.
- PETROV P., SEKERIS C.E., 1971, Exp. Cell Res. 69, 393-401.
Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation.
- POGO A.G., LITTAU V.C., ALFREY V.G., MIRSKY A.E., 1967, Proc. Natl.Acad. Sci. USA; 57 743-750.
Modification of ribonucleic acid synthesis in nuclei isolated from normal and regenerating liver : some effects of salt and specific divalent cations.
- PRICE R.P., RANSOM L., PENMAN S., 1974, Cell 12, 253-258.
Identification of a small subfraction of Hn RNA with the characteristics of a precursor to mRNA.
- PUVION E., BERNHARD W., 1975
Article en préparation.
- QUAGLIAROTTI J., HIDVEGI E.J., WIKMAN J., BUSCH H., 1970, J. Biol.Chem. 245, 1962-1969.
Structural analysis of nucleolar precursors of ribosomal RNA: comparative hybridizations of nucleolar and ribosomal RNA with nucleolar DNA.
- RINGERTZ N.R., 1969,
Handbook of Molec. cyto .(Lima-de-Faria, ed.) p.675 .
North Holland Amsterdam.
- RITOSSA F.M., SPIEGELMAN S., 1965, Proc. Natl. Acad.Sci.USA, 53,737-745
Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*.
- RITOSSA F.M., 1968, Proc. Natl. Acad.Sci.USA, 60,609-516.
Unstable redundancy of genes for ribosomal RNA.
- REEDER R.H. et ROEDER R.G., 1972, J. Mol. Biol. 67, 433-441.
Ribosomal RNA synthesis in isolated nuclei.
- ROEDER R.G. et RUTTER W.J., 1970, Proc. Natl. Acad.Sci.USA, 65,675-682.
Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases.
- SALIM M., MADEN B.E.H., 1973, Nature 244, 334-336.
Early and late methylations in HeLa cell ribosome maturation.
- SAMARINA O.P., LUKANIDIN E.M., MOLNAR J., GEORGIEV G.P., 1968, J. Mol. Biol. 33, 251-263.
Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA.

- SCHERRER K., DARNELL J.E., 1962, Biochem. Biophys. Res; Commun.7,486-490
Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa Cells.
- SCHERRER K., LATHAM H., DARNELL J.E., 1963, Proc. Natl. Acad.Sci.USA; 49, 240-248
Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells.
- SCHERRER K., MARCAUD L., 1965, Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1697-1713.
Polycistronic messenger RNA in animal cells.
- SCHERRER K., MARCAUD L., ZAJDELA F., LONDON I.M., GROS F., 1966, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56, 1571-1578.
Patterns of RNA metabolism in differentiated cell : a rapidly labelled, unstable 60S RNA with messenger properties in chick erythroblasts.
- SCHERRER K., 1973,
Regulation of transcription and translation in eukaryotes (Bautz, Karlson et Kersten éd.) Springer-Verlag Berlin, p.81-104
Formation and regulation of messenger RNA in animal cells.
- SCHOCHETMAN G., PERRY R.P., 1972, J. Mol. Biol. 63, 577-590.
Characterization of the messenger RNA released from L cell polyribosomes as a result of temperature shock.
- SHARMA O.K., HIDVEGI E.J., MARKS F., PRESTAYKO A.W., SMETANA K., BUSCH H. 1969, Physiol. Chem. & Physics 1, 185-209.
Isolation and characterization of 60S and 85S RNA from nuclear fractions of Novikoff hepatoma cells.
- SHELTON E., KUFF E.L., 1966, J. Mol. Biol. 22, 23-31.
Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells.
- SHEPHERD J., MADEN B.E.H., 1972, Nature, 236, 211-214.
Ribosome assembly in HeLa cells.
- SIMARD R., BERNHARD W., 1966, Int. J. Cancer 1, n° 5.
Le phénomène de la ségrégation nucléolaire: spécificité d'action de certains antimétabolites.
- SIMARD R., AMALRIC F., ZALTA J.P., 1969, Exp. Cell Res. 55, 359-369.
Effet de la température supra-optimale sur les RNPs et l'ARN nucléolaires. I. Etude ultrastructurale.

- SIMARD R., SAKR F., BACHELLERIE J.P., 1973, Exp. Cell Res. 81,1-7
Ribosomal precursor particles in ascites tumor cell nucleoli.
- SIMARD R., BACHELLERIE J.P., AMALRIC F. ZALTA J.P., 1975
actuellement soumis pour publication.
In vitro stepwise dissociation of nucleoli isolated from
mammalian cells. II. Ultrastructural study.
- SLAYTER H.S., WARNER J.R., RICH A., HALL C.E., 1963, J. Mol. Biol. 7,652-657
The visualization of polyribosomal structure.
- SPEER H.L., ZIMMERMANN E.F., 1968, Biochem. Biophys. Res. Commun. 32,60-65
The transfer of proteins from cytoplasm to nucleus in HeLa cells.
- SPIRIN A.S., 1974, FEBS letters 40, Suppl. 38-47
Structural transformations of ribosomes (dissociation, unfolding
and disassembly).
- STAMBROOK P., 1974, J. Mol. Biol. 82, 303-313.
The temporal replication of ribosomal genes in synchronized
chinese hamster cells.
- STEVENIN J., JACOB M., 1972, Eur. J. Biochem. 29, 480-488
Etude de la dissociation, par le désoxycholate de sodium, des
polyparticules ribonucléoprotéiques nucléaires du cerveau de rat.
- STEVENIN J., JACOB M., 1974, Eur. J. Biochem. 47, 129-137.
Effects of sodium chloride and pancreatic RNAase on the rat-brain
nuclear particles : the fate of the protein moiety.
- STEVENS R.J., SWIFT H., 1966, J. Cell Biol. 31,55-77.
RNA transport from nucleus to cytoplasm in Chironomus (Tendipes)
salivary glands.
- STRYCHARZ W.A., RANKI M., MARCKER K.A., 1973,
Regulation of transcription and translation in Eukaryotes (Bautz,
Karlson et Kersten, éd.) Springer-Verlag Berlin, p.251-256.
Translational Control in Eukaryotic organisms.
- TAKAHASHI T., SWINT R.B., HURLBERT R.B., 1963, Exp. Cell Res. suppl. 9
330-344
Synthesis of RNA in isolated nuclei of the Novikoff ascites tumor.
- TAMAOKI T., MUELLER G.C., 1965, Biochim. Biophys. Acta 108, 81
A rapidly labeled ribonucleo-protein in HeLa cell nuclei.
- TAMAOKI T., 1966, J. Mol. Biol. 15, 624-639,
The particulate fraction containing 45S RNA in L cell nuclei.

- TAVITIAN A., URETSKY S.C., ACS G., 1969, Biochim. Biophys. Acta 179, 50-
The effect of toyocamycin on cellular RNA synthesis.
- TIOLLAIS P., GALIBERT F., LEPETIT A. AUGER M.A., 1972, Biochimie; 54,
339-354
L'électrophorèse des ARNs en gel de polyacrylamide.
- TIOLLAIS P., GALIBERT F., BOIRON M., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
68, 1117-1120.
Evidence for the existence of several molecular species in the
"45S" fraction of mammalian ribosomal precursor RNA.
- TONIOLO D., MEISS H.K., BASILICO C., 1973
Proc. Natl Acad. Sci. USA 70, 1273-1277.
A temperature-sensitive mutation affecting 28S ribosomal RNA
production in mammalian cells.
- VASQUEZ-NIN G., BERNHARD W., 1971, J. Ultrastruct. Res. 36, 842-860.
Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani
ring granules.
- VESCO C., PENMAN S., 1968, Biochim. Biophys. Acta, 169, 188-195.
The fractionation of nuclei and the integrity of purified nucleoli
in HeLa cells.
- WARNER J.R., SOEIRO R., BIRNBOIM H.C., GIRARD M., DARNELL J.E., 1966
J. Mol. Biol. 19, 349-361.
Rapidly labeled HeLa cell nuclear RNA. I. Identification by zone
sedimentation of a heterogeneous fraction separate from riboso-
mal precursor RNA.
- WARNER J.R., SOEIRO R., 1967, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 1984-1990
Nascent ribosomes in HeLa cells.
- WATSON J.D., RALPH R.K., 1966, Cancer Res. 36; Part. 1., 2362-2367.
Changes in RNA synthesis following transfer of Sarcoma 180
Ascites cells from the mouse to synthetic medium.
- WEINBERG R.A., LOENING U., WILLEMS M., PENMAN S., 1967, Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 58, 1088-1095.
Acrylamide gel electrophoresis of HeLa nucleolar RNA.
- WELLAUER P.K., DAWID I.G., 1973, Proc. Natl. Aca. Sci. USA 70, 2827-2831.
Secondary structure maps of RNA. Processing of HeLa ribosomal RNA.
- WIDNELL C.C., TATA J.R., 1964, Biochem. J. 92, 313-317.
A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver nuclei.
- WIDNELL C.C., TATA J.R., 1966, Biochim. Biophys. Acta 123, 478-492
Studies in the stimulation by ammonium sulphate of the DNA-dependent
RNA polymerase of isolated rat-liver nuclei.

- WINICOV I., PERRY R.P., 1974, *Biochemistry*, 13, 2908-2914.
 Characterization of a nucleolar endonuclease possibly involved
 in ribosomal RNA maturation.
- ZAJDELA F., 1963.
 Colloque Franco-Soviétique (Editions Gauthiers-Villars) p. 49
- ZALTA J.P., ROZENSWAJG R., CARASSO M., FAVARD P., 1962, *C.R. Acad. Sci.*
 (Paris) sér. D., 255, 412-414.
 Isolation of a fraction of cell nuclei with purity control by
 electron microscope.
- ZALTA J., ZALTA J.P., SIMARD R., 1971. *J. Cell Biol.* 51, 563-568.
 Isolation of nucleoli. A method that combines high yield, struc-
 tural integrity and biochemical preservation.
- ZALTA J., ZALTA J.P., 1973.
 Methods in cell biology. Vol. VI. 317-324 (Ed. D. Prescott) Acad. Press
 Basic principles of a method of nucleoli isolation.
- ZIMMERMANN E.F., HACKNEY J., NELSON P., ARIAS I.M., 1969, *Biochemistry*
 8, 2636-2644.
 Protein synthesis in isolated nuclei and nucleoli of HeLa cells.

